

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

الگوی الکتروفورز دو بعدی بافت ریشه در ناهنجاری غلاف بندی سویا

نگارنده: مریم علیاری

اساتید راهنما:

دکتر مهدیه پارسائیان

دکتر محمود تورچی

استاد مشاور:

دکتر ناصر فرخی

بهمن ۱۳۹۶

تقدیم

ماحصل آموختہ ایم را تقدیم می‌کنم به آنان که مہر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی ام است

به استوارترین تکیہ کاہم، دستان پر مہر پدرم

به سبزترین نگاہ زندیکیم، چشمان سبز مادرم

به ہمراہ ہمیشگی و پشتوانہ زندیکیم، ہمسر عزیزم کہ نشانہ لطف الہی در زندگی من است

کہ ہرچہ آموختم در مکتب عشق شما آموختم و ہرچہ بگو شتم قطرہ ای از دریای بی کران مہربانیان را پاس توانم بگویم.

بوسہ بردستان پر مہر تان

پاسکزاری

حمد و سپاس یکتای بی‌همتا را که لطفش بر ما عیان است، ادای شکرش را بیچ زبان و دیای فضلش را بیچ کران نیست و اگر در این وادی، مستیم، همه محبت اوست.

اینک که حاصل همه تلاش ما، شمر شمر واقع شد بر خود لازم می‌دانم تا مراتب سپاس را از بزرگوارانی به جا آورم که اگر دست یاریکشان نبود هرگز این پایان نامه به انجام نمی‌رسید.

سپاس بی‌کران از مساعی، بهکاری و نقطه نظرات استاد بزرگوار، خانم دکتر مهدیه پارسایان که همواره آسمان صبر و دشت علمشان فراراه تلاشم بودند و بارهای بی‌شماریشان از سختی‌هایم آسان نمودند.

سپاس فراوان از اساتید بزرگوار، جناب آقای دکتر محمود تورچی و جناب آقای دکتر ناصر فرخی که در طول مدت انجام این پژوهش بارهای بی‌شمار عالمه و بجایشان، سکا در سایه‌ای دهادیت این پایان نامه بوده اند به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگار ان بهترین پشتیبانان هستند.

سپاس فراوان از هیئت داوران جناب آقای دکتر شاهرخ قریبیک که داوران پایان نامه اینجانب را عمده دار شدند.

و سپاس از معربان ترین همراهان زندگیم، پدر و مادر و همسر عزیزم که حضورشان در فضای زندگیم مصداق بی‌ریای سخاوت بوده است و هر خطه وجودم را از چشمه سار پر از عشق چشمانشان سیراب می‌کنند.

از سرکار خانم مهندس سهیلا محمدی به خاطر بهرامی در آزمایشگاه نهایت شکر را دارم.

تعهد نامه

اینجانب مریم علیاری دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه الگوی الکتروفورز دو بعدی بافت ریشه در ناهنجاری غلاف بندی سویا تحت راهنمایی دکتر مهدیه پارساییان و دکتر محمود تورچی متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام «دانشگاه صنعتی شاهرود» و یا «Shahrood University of Technology» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.

استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده: عارضه ناهنجاری غلافبندی سویا نوع ویژه‌ای از رشد است که گیاهان سویا مدت‌ها پس از رسیدگی غلاف‌ها، همچنان سبز باقی می‌مانند. ساقه‌های سبز و حتی برخی اوقات برگ‌ها و دم‌برگ‌های سبز می‌تواند مشکلات متعددی در زمان برداشت ایجاد کنند و ممکن است منجر به کاهش عملکرد شوند. به منظور بررسی علل تظاهر ناهنجاری غلافبندی سویا در رقم کتول، مقایسه پروفایل بیان پروتئین‌های گیاهان سالم و مبتلا انجام گرفت. برای این منظور نمونه‌های ریشه در مرحله رشد رویشی R6 به روش پیمایشی انتخاب شدند و پروتئین آنها به روش بافر فسفات استخراج شدند. ژل الکتروفورز دو بعدی منجر به ظهور ۱۲۴ لکه پروتئینی تکرار پذیر شد: ۳۴ لکه بر اساس شاخص IF (فاکتور القا)، دارای تغییرات بیان معنی‌دار بودند که با انجام آزمون t، ۱۱ لکه پروتئینی در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار گردید. بیشتر این پروتئین‌ها در تولید انرژی، متابولیسم، انتقال سیگنال، تقسیط و ذخیره‌سازی پروتئین‌ها شرکت دارند. در پاسخ به این عارضه، پروتئین گلوتامات دهیدروژناز، مالات دهیدروژناز، گلیکوپروتئین ۳۱ کیلو دالتونی ساقه‌ای، 14-3-3-like protein، و همچنین پروتئین‌های Ros و سم زدایی شامل Germin like protein و Thioredoxin و یک پروتئین ناشناخته، همگی کاهش بیان نشان دادند. به طور کلی، این نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً تغییر بیان برخی پروتئین‌های اختصاصی در ریشه گیاهان ممکن است نقش مهمی در تظاهر ناهنجاری غلافبندی سویا داشته باشد.

کلمات کلیدی: سویا، ناهنجاری غلاف بندی سویا، پروتئومیکس

عنوان مقاله:

الگوی الکتروفورز دو بعدی بافت ریشه در ناهنجاری غلاف بندی سویا

Two-dimensional gel electrophoresis pattern of root tissue in
soybean pod syndrome

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول : کلیات.....	۱
مقدمه	۲
۱-۱- سویا	۴
۱-۲- تولید سویا در ایران و جهان	۵
۱-۳- مراحل رشد سویا	۵
۱-۴- ارقام سویا	۶
۱-۵- اهمیت سویا	۶
۱-۵-۱- اهمیت اقتصادی سویا	۶
۱-۵-۲- اهمیت غذایی سویا	۷
۱-۶- تاریخچه ناهنجاری غلاف بندی سویا	۸
۱-۷- پروتئومیک	۹
اهداف تحقیق	۱۲
فصل دوم : بررسی منابع.....	۱۳
۱-۲- شکل های مختلف تظاهر عارضه ناهنجاری غلاف بندی سویا	۱۴

- ۲-۲- خسارت عارضه ناهنجاری غلاف بندی سویا ۱۵
- ۳-۲- دلایل ایجاد ناهنجاری غلاف بندی سویا ۱۶
- ۱-۳-۲- فرضیه اقلیمی و آگرونومیکی ۱۷
- ۱-۳-۲-۱- تنش حرارتی ۱۷
- ۲-۳-۲-۱- تنش خشکی ۱۸
- ۲-۳-۲- فرضیه بیولوژیکی ۱۸
- ۳-۳-۲- فرضیه فیزیولوژیکی ۱۹
- ۴-۳-۲- فرضیه ژنتیکی ۲۰
- ۴-۲- رهیافت پروتئومیک در سویا ۲۱
- ۵-۲- پروتئومیک ریشه سویا ۲۱
- ۶-۲- پروتئومیک برگ سویای دارای ناهنجاری غلاف بندی ۲۴
- فصل سوم : روش ۲۷
- ۱-۳- سویا رقم کتول (DPX) ۲۸
- ۲-۳- نمونه گیری ۲۸
- ۳-۳- الکتروفورز دو بعدی ۲۹
- ۱-۳-۳- استخراج پروتئین ۲۹

- ۳۲-۳-۲- تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد ۳۲
- ۳۳-۳-۳- تهیه ژل بعد اول (محلول IEF) ۳۳
- ۳۴-۳-۴- الکتروفورز بعد اول (IEF) ۳۴
- ۳۴-۳-۵- الکتروفورز بعد دوم (SDS-PAGE) ۳۴
- ۳۷-۳-۶- رنگ آمیزی و رنگ بری ژل ۳۷
- ۳۷-۳-۷- تصویر برداری و تجزیه کمی لکه‌های پروتئینی ۳۷
- ۴۱- فصل چهارم : نتایج ۴۱
- ۴۲-۴-۱- تغییر بیان پروتئین‌ها در شرایط ابتلا به ناهنجاری غلاف بندی سویا ۴۲
- ۴۵-۴-۲- طبقه‌بندی پروتئین‌های دارای تغییرات بیان بر اساس عملکرد ۴۵
- ۴۵-۴-۲-۱- پروتئین‌های دخیل در متابولیسم و تولید انرژی ۴۵
- ۴۵-۴-۲-۱-۱- گلوتامات دهیدروژناز ۴۵
- ۴۸-۴-۲-۱-۲- متیونین سنتتاز ۴۸
- ۴۹-۴-۲-۱-۳- ملات دهیدروژناز ۴۹
- ۵۱-۴-۲-۲- پروتئین‌های دخیل در تقسیط و ذخیره سازی پروتئینی ۵۱
- ۵۱-۴-۲-۲-۱- گلیکو پروتئین ۳۱ کیلو دالتونی ساقه‌ای ۵۱
- ۵۳-۴-۲-۳- پروتئین دخیل در انتقال سیگنال ۵۳

۴-۲-۴- پروتئین‌های مهار کننده ROS و سم زدایی ۵۵

۴-۲-۴-۱- پروتئین Germin-Like ۵۵

۴-۲-۴-۲- پروتئین تیروئیدوکسین ۵۷

۴-۲-۵- پروتئین ناشناخته ۵۸

نتیجه‌گیری کلی ۵۹

پیشنهادهای ۶۰

منابع ۶۱

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱-۱- درصد و مواد تشکیل دهنده دانه سویا.....	۸
جدول ۱-۲- مساحت زیر کشت، مقدار تولید و مبلغ خرید سویا در استان گلستان.....	۱۵
جدول ۲-۲- خسارت عارضه ناهنجاری غلاف بندی سویا در استان گلستان بر اساس اطلاعات بیمه- ای	۱۶
جدول ۱-۴- اطلاعات کامل پروتئین‌ها در تطبیق با پروتئین‌های پایگاه داده‌ای NCBI.....	۴۴

فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۳-۱- نمونه ریشه سویای سالم (الف) و مبتلا به ناهنجاری غلاف بندی (ب).....	۲۹
شکل ۳-۲- غلظت‌های استانداردسازی نمونه‌های پروتئینی.....	۳۲
شکل ۳-۳- مراحل مختلف اجرای الکتروفورز ژل دو بعدی.....	۴۰
شکل ۴-۱- تغییرات بیان معنی دار پروتئین ها در رقم کتول سویای دارای ناهنجاری غلاف بندی.....	۴۲
شکل ۴-۲- لکه‌های پروتئینی شناسایی شده با استفاده از 2DE از ریشه سویا در شرایط مبتلا به ناهنجاری غلاف بندی (A) و شاهد (B).....	۴۳
شکل ۴-۳- میزان بیان لکه پروتئینی ۸۵۰۱ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف بندی.....	۴۷
شکل ۴-۴- میزان بیان لکه پروتئینی ۴۸۰۱ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف بندی.....	۴۸
شکل ۴-۵- میزان بیان لکه پروتئینی ۳۴۰۱ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف بندی.....	۵۰
شکل ۴-۶- میزان بیان لکه پروتئینی ۶۴۰۲ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف بندی.....	۵۲
شکل ۴-۷- میزان بیان لکه پروتئینی ۹۳۰۱ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف بندی.....	۵۳
شکل ۴-۸- میزان بیان لکه پروتئینی ۲۳۰۱ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف بندی.....	۵۴
شکل ۴-۹- میزان بیان لکه پروتئینی ۱۲۰۱ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف بندی.....	۵۴

شکل ۴-۱۰- میزان بیان لکه پروتئینی ۲۲۰۱ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف بندی....۵۶

شکل ۴-۱۱- میزان بیان لکه پروتئینی ۳۱۰۱ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف بندی ..۵۶

شکل ۴-۱۲- میزان بیان لکه پروتئینی ۵۱۰۱ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف بندی ..۵۷

شکل ۴-۱۳- میزان بیان لکه پروتئینی ۸۳۰۲ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف بندی ..۵۸

فصل اول

کلیات

مقدمه

جمعیت جهان در سال ۲۰۱۷ میلادی در حدود ۷/۶ میلیارد نفر بود و به نظر می‌رسد که با این روند رشد جمعیت جهان در سال ۲۰۵۰ از مرز نه میلیارد نفر خواهد گذشت که بخش عمده‌ای از این افزایش جمعیت در کشورهای فقیر و در حال توسعه اتفاق می‌افتد. پیش بینی می‌شود سطوح قابل کشت برای محصولات کشاورزی دنیا از متوسط ۰/۴۵ هکتار در سال ۱۹۶۰ به مساحت ۰/۱۸ هکتار برای هر نفر در سال ۲۰۵۰ کاهش پیدا کند (Alexandratos & Bruinsma, 2012). در ایران، مصرف روغن‌های گیاهی با توجه به افزایش جمعیت کشور و نیز تغییر الگوی غذایی مردم در حال افزایش است. در حال حاضر بالغ بر ۹۰ درصد روغن مورد نیاز از خارج کشور وارد می‌گردد و همه ساله سهم قابل توجهی از درآمد کشور به خرید روغن و محصولات جانبی دانه‌های روغنی اختصاص می‌یابد، بنابراین برنامه‌ریزی برای افزایش تولید دانه‌های روغنی در کشور ضروری به نظر می‌رسد. از طرف دیگر، به دلیل پر هزینه بودن تولید پروتئین‌های حیوانی انتظار می‌رود کمبودها از طریق استفاده از پروتئین‌های گیاهی تامین شود و با توجه به جایگاه ارزشمند سویا، اهمیت تحقیقات روی عوامل موثر بر افزایش تولید سویا در کشور به خوبی روشن است (برزعلی، ۱۳۸۲).

سویا (*Glycine max L.*) گیاهی دولپه، یک ساله از خانواده پروانه‌آسانان و از دانه‌های روغنی مهم می‌باشد که موارد استفاده زیادی در کشاورزی و صنعت دارد و از قدیم در زمره یکی از پنج دانه مقدس (گندم، جو، ارزن، برنج و سویا) به شمار می‌آمد (لطیفی، ۱۳۷۲). جایگاه ارزشمند این محصول به دلیل روغن زیاد و پروتئین فراوان دانه است که به ترتیب ۲۰ و ۴۰ درصد از وزن دانه را شامل می‌گردد (خوانقواه، ۱۳۸۰). استان گلستان به دلیل شرایط مناسب اقلیمی و خاک حاصلخیز، از دیر باز مستعد کشت دانه‌های روغنی بوده است و با سطح زیر کشت حدود ۶۰ هزار هکتار، از مناطق مهم کشت سویا در کشور محسوب می‌شود. با توجه به اهمیت موضوع و جایگاه کشت سویا در استان

گلستان بررسی عوامل کاهش دهنده عملکرد ارقام سویا و استفاده از روش‌های اصلاح نباتات سنتی و معرفی شیوه‌های جدید بیوتکنولوژی جهت افزایش کیفی و کمی عملکرد آن ضروری به نظر می‌رسد.

عوامل متعددی به محصول سویا خسارت وارد می‌کنند و منجر به کاهش عملکرد آن می‌گردند. در بین این عوامل ناهنجاری غلاف بندی سویا از عوامل خسارت‌زای مهم به این محصول استراتژیک است. این ناهنجاری با ظهور حالات مختلفی از جمله رشد علفی، کوتولگی، ریزش شدید گل‌ها و غلاف‌ها، تشکیل و تجمع گل‌ها و غلاف‌های غیر طبیعی، کوتاه شدن فاصله میانگره‌ها، عدم تشکیل دانه در غلاف و نظایر آن همراه است (چراغعلی، ۱۳۶۷). فرضیه‌های متفاوتی از جمله آگرونومیکی (Leonard *et al.*, 2011)، فرضیه اقلیمی (Wiebold, 2010)، بیولوژیکی مانند آفات و بیماری‌ها (Giesler *et al.*, 2002)، فیزیولوژیکی (Morrison, 2009؛ Holshouser, 2009) و ژنتیکی (Leonard *et al.*, 2011) در رابطه با تظاهر این ناهنجاری پیشنهاد شده است. به هر حال، ناهنجاری غلاف بندی سویای سبز در اثر واکنش گیاه نسبت به فاکتورهای مختلف و تغییرات بیان پروتئین‌های مختلف در گیاه تظاهر می‌یابد. بنابراین، بررسی پروتئوم گیاه سویا یکی از راهکارهای تشخیص پروتئین‌های درگیر در این فرآیند در سطح مولکولی می‌باشد. پروتئومیک ابزار قدرتمندی برای مطالعه تغییرات بیان پروتئین‌های مختلف در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی است. این رهیافت با شناسایی پروتئین‌های درگیر در فرآیندهای فیزیولوژیکی و متابولیکی کمک می‌کند تا سازوکار پروتئین‌های درگیر در این فرآیندها در سطح مولکولی مورد بررسی قرار گیرد و درک بهتری از پاسخ گیاه به تنش‌های زیستی و غیر زیستی حاصل شود (Xing *et al.*, 2002). در سال‌های اخیر از رهیافت پروتئومیک برای بررسی بیان متمایز پروتئین‌ها در شرایط تنش‌های زیستی و غیر زیستی استفاده شده است (Toorchi *et al.*, 2009). از طرفی، بررسی‌های پروتئومیک نقش مهمی در تشخیص انواع بیماری‌ها دارد. با ظهور فناوری پروتئومیک، تلاش‌های زیادی برای شناسایی و رده بندی پروتئین‌های مختلف اندام‌ها صورت گرفته است. آنالیزهای پروتئومیک دریچه جدیدی را برای شناسایی تغییرات روی داده

در روند بیماری به روی ما گشوده است. یکی از اهداف اصلی پروتئومیک، کشف بیومارکرهای مرتبط با تنش‌های زیستی و غیر زیستی است (عضدی و دلیلان، ۱۳۹۰).

۱-۱- سویا

سویا یا لوبیا روغنی با نام علمی *Glycine max L.* و دارای $2n=2x=40$ کروموزم، گیاهی است که در اکثر نقاط دنیا به خاطر برداشت دانه‌اش کشت می‌شود و اغلب نبات معجزه آسا نامیده می‌شود. سویا از دانه‌های روغنی بومی آسیا و مناطق منچوری، چین و ژاپن است و از یک گونه وحشی به نام *Glycine Ussuriensis* مشتق شده است (Hymowitz & Singh, 1987). سویا اسامی فارسی مختلفی مانند سوژا، لوبیا چینی، لوبیا روغنی، پشم باقلا و خرس باقلا دارد (کریمی و رنجبر، ۱۳۶۷). این دانه روغنی در قرن هفدهم در اروپا و در سال‌های ۱۸۰۴ و ۱۸۸۲ در آمریکا و برزیل شناخته شد. طی سال‌های ۱۳۱۸ و ۱۳۱۹ انواع مختلفی از سویا از آلمان وارد کشور ایران شد و در بنگاه اصلاح نباتات مورد آزمایش قرار گرفت. علی‌رغم عملکرد خوب آن در کلیه آزمایش‌ها، به علت عدم وجود بازار فروش مناسب، توسعه پیدا نکرد. اما اولین بار گروه صنعتی بهشهر با وارد کردن ارقام سویا از آمریکا در اوایل دهه ۴۰ کشت و کار آن را جهت مصارف صنعتی آغاز نمود (خواجه‌پور، ۱۳۸۳). زراعت سویا به عنوان دانه روغنی از حدود سال ۱۳۴۲ با وارد کردن بذر آن به ایران در مناطقی مانند مازندران آغاز و متعاقب آن کشت سویا توسط شرکت سهامی دانه‌های روغنی در برخی دیگر از نقاط کشور معمول شد. کشت سویا هم در بهار و هم در تابستان انجام می‌شود. کشت دوم آن در ایران بعد از محصولاتی چون گندم، جو، سیب‌زمینی، کاهو و باقلا انجام می‌شود و بدین لحاظ نیاز به اختصاص زمینی خاص برای کشت ندارد. مهمترین مناطق کشت سویا در کشور استانهای مازندران، گلستان، لرستان و دشت مغان است (احمدی، ۱۳۷۸).

سویا گیاهی خودگشن و گرما دوست است که در طول رشد به نور و گرمای فراوان نیاز دارد و به خشکی و شوری حساس است. سویا گیاهی روز کوتاه است که نسبت به سایر گیاهان به طول روز حساس تر می باشد و دارای دو تیپ رشد محدود و نامحدود است.

۱-۲- تولید سویا در ایران و جهان

اگرچه منشاء اصلی سویا آسیا می باشد ولی امروزه تولید سویا در ایالات متحده آمریکا بیش از آسیا است. در سال ۲۰۰۹ آمریکا ۴۱/۲ درصد تولید جهانی و بعد از آن کشورهای برزیل، آرژانتین و چین به ترتیب ۲۵/۶، ۱۴ و ۶/۵ درصد در رده مهم ترین کشورهای تولید کننده سویا قرار دارند. سطح زیر کشت سویا در ایران در سال ۱۳۸۸ برابر ۸۴۰۸۴ هکتار با تولید ۲۰۷/۴ هزار تن بود که ۶۸۸۲۶ هکتار آن آبی و ۱۵۲۵۸ هکتار دیم می باشد. سویا در استان گلستان در سال ۱۳۸۸ به میزان ۵۴۶۷۸ هکتار کشت گردید. این سطح ۶۵ درصد از سطح زیر کشت کل سویا کشور را شامل می شود. سطح کشت سویا آبی در استان گلستان ۴۹۶۰۰ هکتار با تولید ۱۲۲۶۷۸ تن و متوسط عملکرد ۲۴۷۳ کیلوگرم در هکتار و سطح کشت دیم ۵۰۷۸ هکتار با تولید ۷۶۳۳/۰۶ تن و متوسط عملکرد ۱۵۰۳ کیلوگرم در هکتار بوده است. از نظر پراکنش جغرافیایی این محصول، بیش از ۹۰ درصد از اراضی زیر کشت سویا در استان های مازندران و گلستان قرار دارد. (آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۸۹). براساس آخرین آمار فائو، سطح زیر کشت سویا در ایران ۶۳۵۸۲ هکتار با تولید ۱۴۴۱۸۹ تن و بازده ۲۹۰۴/۶ کیلوگرم در هکتار می باشد (FAOSTAT, 2016).

۱-۳- مراحل رشد سویا

مراحل رشد گیاه سویا بر اساس سیستم مرحله بندی فهر به دو بخش مجزای رویشی (E) و زایشی (R) تقسیم می شود (Fehr & Caviness, 1980). مراحل رویشی شامل Ve (سبز شدن)، Vc (کوتیلدون)، V₁ (اولین گره) و V₂ (دومین گره) تا Vn می باشد و بسته به واریته و شرایط محیطی

متغیر خواهد بود. مراحل زایشی شامل R_1 (آغاز گلدهی)، R_2 (گلدهی کامل)، R_3 (شروع غلاف بندی)، R_4 (غلاف دهی کامل)، R_5 (شروع دانه بندی)، R_6 (دانه بندی کامل)، R_7 (آغاز رسیدگی) و R_8 (رسیدگی کامل) می باشد که بسته به ژنوتیپ، طول روز و دما متغیر می باشد. شروع هر مرحله، زمانی است که ۲۵ درصد بوته ها در آن مرحله باشند و پایان آن زمانی است که ۷۵ درصد بوته ها در آن مرحله قرار داشته باشند (Fehr & Caviness 1980).

۱-۴- ارقام سویا

ارقام سویا را می توان از لحاظ نوع مصرف در ۳ گروه علوفه ای، روغنی و حبوبات قرار داد. ارقام علوفه ای دارای دانه کوچک به رنگ سبز مایل به سیاه، ساقه های ظریف و شاخ و برگ زیادتری در مقایسه با ارقام روغنی می باشد. رنگ دانه در ارقام روغنی زرد است. ارقامی که به مصرف خوراکی می رسند، دارای دانه ای به رنگ قهوه ای می باشند. ارقام سویا از نظر گروه های رسیدگی به ۱۴ تیپ تقسیم بندی می شوند و به هر یک از این تیپ ها یک کد را نسبت می دهند که عبارتند از ۰۰، ۰، ۱، ۲،.....، ۱۲ که زودرس ترین ارقام در تیپ ۰۰ و دیررس ترین آنها در تیپ ۱۲ قرار می گیرند. ارقام دیررس در نواحی استوایی و ارقام زودرس در نواحی شمال کشت می شوند. در ایران از ارقام ۲ تا ۷ استفاده می شود. با توجه به دامنه گسترده رسیدگی در ارقام سویا، می توان آنها را در تمام نقاط دنیا کشت نمود.

۱-۵- اهمیت سویا

۱-۵-۱- اهمیت اقتصادی سویا

مسئله اقتصاد صنعت سویا بسیار پیچیده است. ولی اصولاً سه بازار عمده یعنی برای دانه، روغن و کنجاله موجود است. با توجه به میزان بالای پروتئین و روغن موجود در دانه سویا و همچنین عملکرد مناسب آن در واحد سطح که بخش عمده ای از تولید روغن های خوراکی مورد مصرف انسان و

دام را تشکیل می‌دهد و همچنین کاربردهای متنوع آن اهمیت این گیاه مهم روشن‌تر می‌گردد (فرجی و همکاران، ۱۳۹۱).

۱-۵-۲- اهمیت غذایی سویا

در بسیاری از کشورهای جهان سویا را به منظور روغن، پروتئین گیاهی و علوفه کشت می‌کنند (جدول ۱-۱). انواع فرآورده‌های پروتئینی سویا که به بازار عرضه می‌شود شامل کنجاله سویا، آرد سویا، کنسانتره و پروتئین سویا هستند. کنجاله سویا امروزه حدود ۶۰ درصد کنجاله مصرفی جهان را شامل می‌شود چرا که کنجاله بدون چربی سویا برای انسان و حیوان یک غذای پروتئینی محسوب می‌شود، به نحوی که تقاضا برای کنجاله سویا در سال‌های اخیر بیش از تقاضا برای روغن سویا بوده است. افزایش در تولید کنجاله سویا به دلیل قیمت مناسب و سهولت تهیه آن است (لطیفی؛ ناصری، ۱۳۷۵ و ۱۳۷۰). کنسانتره و ایزولات‌های پروتئین سویا به دلیل خاصیت ژلاتینی و پایداری خواص امولسیون به عنوان جانشین مواد جامد شیر بدون چربی در تهیه فرآورده‌های گوشتی استفاده می‌شود. سویا از معدود نباتاتی می‌باشد که فراهم کننده پروتئین کامل است بطوریکه دارای ۸ اسید آمینه ضروری از جمله ایزولوسین، لوسین، لیزین، فنیل آلانین و والین برای سلامتی انسان است (کریمی، ۱۳۶۸). پروتئین سویا دارای ارزش بیولوژیک زیاد است و دانه‌ی آن غنی از مواد غذایی قابل هضم، کلسیم زیاد، آهن و ویتامین‌های مختلف است (ناصری، ۱۳۷۰). کنسانتره پروتئین سویا را به فرم‌های مختلف جهت تهیه بعضی از محصولات گوشتی و همچنین نوعی بافت در افزایش حجم گوشت بکار می‌برند (فرجی و همکاران، ۱۳۹۱).

جدول ۱-۱: درصد و مواد تشکیل دهنده دانه سویا (آلیاری، ۱۳۷۹)

ماده تشکیل دهنده	مقدار (درصد)
پروتئین	۳۵ - ۴۵
روغن	۱۶ - ۲۴
پوسته	۸
هیدرات‌های کربن	۱۴ - ۲۴
خاکستر (مواد معدنی)	۳۶
رطوبت	۷ - ۱۱

۱-۶- تاریخچه ناهنجاری غلاف بندی سویا

ناهنجاری غلاف بندی سویا در ایران ابتدا در سال ۱۳۶۴ در مزارع استان مازندران قدیم (گلستان و مازندران فعلی) در سطح حدود ۷۰۰ هکتار و به خصوص در مزارع کشت تابستانه واریته گرگان ۳ مشاهده گردید (علوی، ۱۳۸۱). همه ساله در استان گلستان و در قسمت‌هایی از استان مازندران بیش از ۴ تا ۸ هزار هکتار از مزارع سویا به ناهنجاری غلاف بندی سویا مبتلا می‌گردد. در کشورهای خارجی، سندروم ساقه سبز (نوع خفیف‌تر سندروم سویای سبز) اولین بار در کانزاس در سال ۱۹۴۷ گزارش شده است و تا قبل از یک دهه پیش بیشتر کشاورزان و محققین با این سندروم آشنا نبودند ولی در حال حاضر به طور گسترده‌ای در همه مناطق سویا کاری گسترش یافته است (Morrison, 2009). ناهنجاری غلاف بندی سویای سبز در سرتاسر ایالت متحده هر ساله رخ می‌دهد. به عنوان مثال، در سال ۲۰۰۸ این ناهنجاری در ویرجینیا بیشتر از مناطق دیگر بود و خسارت قابل ملاحظه‌ای را بر جای گذاشته است (Holshouser, 2009). در برزیل این ناهنجاری در قسمت‌های شمالی شیوع پیدا کرده است و منجر به کاهش ۴۰ تا ۶۰ درصدی محصول شده است و بنا بر تشابه

نام آن با بیماری جنون گاوی، روشی برای مبارزه با آن پیشنهاد نشده است (Zimmerman, 2010)؛ هم اکنون در ایالات متحده این سندروم به مناطق معتدل جنوبی نیز گسترش یافته است و خسارت قابل توجه و جبران ناپذیری را به کشاورزان تحمیل می‌کند (Dawely, 2010). جادها و همکاران (Jadhav et al., 2013) علائم مشابهی را در مناطق وسیع سویا کاری هندوستان گزارش کردند.

۱-۷- پروتئومیک

اولین بار ویلکینز و همکاران (Wilkins et al., 1996)، در دهه ۱۹۹۰ اصطلاح پروتئوم^۱ و پروتئومیک را مطرح کردند، که بازتابی از دیگر رویکردهای *-omics* است. پروتئومیک علم مطالعه الگوی پروتئین‌های سلول، بافت یا کل موجود زنده جهت شناسایی ماهیت، فعالیت و واکنش‌های بین سلولی است. دقت و حساسیت این روش مبتنی بر استفاده از الکتروفورز دو بعدی، تجزیه کمی لکه های پروتئینی، لکه‌گذاری و شناسایی پروتئین‌ها بوسیله‌ی توالی‌یابی یا طیف سنجی جرمی است. تفکیک و جدا سازی پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز دو بعدی، ابزار پایه‌ای پروتئومیک می‌باشد و اجازه می‌دهد تا پروتئین‌ها هم‌زمان تفکیک شوند (Chen et al., 2002). میزان اطلاعات مربوط به بیان پروتئین‌هایی که از طریق الکتروفورز ژل دو بعدی شناسایی شده‌اند، به سرعت در حال گسترش است (Parker et al., 2006). پروتئومیک نقش محوری را در بیولوژی سیستم‌ها ایفا می‌کند زیرا تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم^۲ و متابولوم^۳ را تکمیل می‌کند. از آنجایی که بیان ژن‌ها در مراحل مختلفی تنظیم می‌شوند بنابراین پیشگویی میزان پروتئین‌های یک سلول از روی مقادیر mRNA به

1- Proteome

2- Transcriptome

3- Metabolome

ویژه در مورد پروتئین‌های نادر کار دشواری است. همچنین تجمع پروتئین‌هایی که در ترانسایم پیام درگیر هستند، دستخوش تغییرات پس از رونویسی و پس از ترجمه می‌شوند (Huck, 2004).

پروتئومیک رهیافت قدرتمندی برای مطالعه‌ی تغییرات بیان پروتئین‌های مختلف در پاسخ به تنش-های زیستی و غیرزیستی است (Xing *et al.*, 2002). امروزه با توجه به پیشرفت روز افزون زیست فناوری علاوه بر ژنومیک و پروتئومیک علوم دیگری نظیر ترانس کریپتومیک^۱ و متابولومیک^۲ نیز بوجود آمده است (Rabilloud and Chevalet, 2002). با تکمیل پروژه ژنوم انسان مشخص شد که مکانیسم مولکولی رفتار سلول‌ها در شرایط مختلف را نمی‌توان از روی توالی ژن‌ها پیشگویی کرد. رفتار سلولی و تمام فعالیت‌هایی که در سلول انجام می‌شود، به عهده پروتئین‌هاست. در واقع برای ارتباط ژنوم با رفتار سلول‌ها باید پروتئین‌های سلولی را شناسایی کرد. به کلیه پروتئین‌هایی که در یک سلول در یک زمان مشخص بیان می‌شوند، پروتئوم آن سلول گفته می‌شود و این پروتئوم است که فاصله بین ژنوم و مکانیسم مولکولی، رفتار سلولی را پر می‌کند. برخلاف ژنوم برای هر موجود زنده نمی‌توان یک پروتئوم واحد تعریف کرد. پروتئوم سلول‌های مختلف با یکدیگر متفاوت‌اند. یعنی سلول‌ها علاوه بر پروتئین‌های ضروری که در همه انواع سلول‌ها بیان می‌شوند، دارای یکسری پروتئین‌های اختصاصی نیز هستند. از این رو بهتر است پروتئوم را برای هر یک از انواع سلول‌ها تعریف نمود. با این حال پروتئوم یک نوع سلول نیز همیشه ثابت نیست. سلول در برابر شرایط مختلف محیطی و پیام‌هایی که از سلول‌های اطراف دریافت می‌کند، پروتئین‌های مختلفی را بیان می‌کند. به عبارت دیگر هر سلول تحت شرایط مختلف پروتئوم‌های متفاوتی دارد. بنابراین برای شناسایی سازوکارهای مولکولی رفتار سلولی و واکنش‌های زیستی، لازم است پروتئین‌هایی که در یک سلول بیان می‌شود، تغییرات آنها در شرایط مختلف، عملکرد آنها و همچنین برهم‌کنش‌های بین پروتئین‌های مختلف در یک سلول بررسی

1- Transcriptomic

2- Metabolomic

شوند. به مجموعه این بررسی‌ها، نقشه برداری پروتئوم یا پروتئومیک اطلاق می‌شود. نقشه برداری پروتئوم یا مطالعه پروتئوم به سادگی مطالعه ژنوم نیست، زیرا پروتئین‌ها را نمی‌توان همانند DNA به روشی مشابه PCR^۱ تکثیر نمود. بنابراین برای مطالعه‌ی پروتئوم باید از ابزار و روش‌های ویژه‌ای استفاده نمود. در پروتئومیک نه تنها کلیه پروتئین‌هایی که در یک سلول در یک شرایط مشخص بیان می‌شوند، بلکه عملکرد و رفتار آنها، برهم‌کنش بین پروتئین‌های مختلف، آرایش‌هایی که پس از ترجمه بر روی پروتئین‌ها ایجاد می‌شود و نیمه عمر آنها در سلول نیز مورد بررسی قرار می‌گیرد (Rabilloud and Chevalet, 2002).

در واقع پروتئومیک از سه بخش تعیین کلیه پروتئین‌های در حال بیان در سلول (شناسایی پروتئین-های سلول تحت یک شرایط معین مانند (حالت استراحت، رشد، تمایز، بیماری، تاثیر دارو و ...)) و پی بردن به عملکرد آن‌ها)، تعیین برهم‌کنش‌های بین مولکولی (پروتئین‌ها در سلول به صورت منفرد عمل نمی‌کنند و اغلب تاثیر خود را با همکاری پروتئین‌های دیگر و برهم‌کنش با آنها اعمال می‌کنند) و تغییرات پس از ترجمه (اغلب پروتئین‌ها پس از ترجمه متحمل آرایش‌های مختلفی مانند گلیکوزیله شدن، متیله شدن، استیله شدن، فسفریله شدن و ... می‌شوند. این آرایش‌ها بر فعالیت و عملکرد پروتئین‌ها، همچنین ساختار فضایی، پایداری و نیمه عمر آنها تاثیر می‌گذارد) تشکیل می‌شود.

ابداع روش پروتئومیک به اواخر دهه ۱۹۷۰ بر می‌گردد که در آن زمان محققان قصد ایجاد پایگاه داده‌های پروتئین با استفاده از روش الکتروفورز دو بعدی^۲ داشتند (O'Farrell 1975). این امر زمینه استفاده از لکه‌های ژل دو بعدی برای تهیه بانک اطلاعاتی تمام پروتئین‌های بیان شده را بوجود آورد. اوفارل (O'Farrell 1975) با ادغام دو روش ایزوالکتریک فوکوسینگ (IEF)^۳ در ژل‌های لوله‌ای و

1-Polymerase Chain Reaction

2- Two dimensional gel electrophoresis (2-DE)

3- Isoelectric focusing (IEF)

SDS- PAGE^۱، پایه‌گذار فناوری نوین الکتروفورز دو بعدی (2-DE) برای جداسازی ترکیب‌های پیچیده پروتئینی بود. با این روش پروتئین‌ها در بعد اول (IEF) بر اساس بار و در بعد دوم (SDS-PAGE) بر اساس جرم مولکولی جداسازی می‌شوند.

اهداف تحقیق

هدف از انجام این پژوهش تحلیل تغییرات سلولی در سطح پروتئین‌ها در بافت ریشه‌ی سویای سالم و سویای دارای ناهنجاری غلاف بندی^۲ می‌باشد تا فرضیه‌های مطرح شده مورد بررسی قرار گیرد و به امکان سنجی تعیین کاندیدای دخیل در سطح مولکولی و شکل‌گیری این عارضه پرداخته شود. با شناسایی پروتئین‌های احتمالی متأثر از این عارضه، نقش آن‌ها و ارتباط منطقی آن‌ها با عارضه در مطالعات آتی مورد بررسی بیشتر قرار خواهد گرفت.

1- Sodium dodecyl solfat polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

2- Green Soybean Syndrome

فصل دوم

بررسی منابع

۱-۲- شکل‌های مختلف تظاهر عارضه ناهنجاری غلاف بندی سویا

عارضه ناهنجاری غلاف بندی سویا به شکل‌های متفاوتی تظاهر می‌یابد که عبارتند از :

(۱) تمام قسمت‌های گیاهی از جمله برگ‌ها، دمبرگ‌ها و ساقه‌ها به طور کلی سبز باقی می‌مانند و در قسمت جوانه‌های جانبی غنچه‌های گل بصورت دسته‌هایی که غالباً عقیم هستند تشکیل می‌گردد. در این گونه مزارع محصولی قابل برداشت نیست به طوری که این حالت شدیدترین وضعیت تظاهر این عارضه است.

(۲) در برخی اوقات درصدی از گل‌هایی که بصورت دسته‌ای تشکیل شده‌اند به غلاف تبدیل می‌گردند به گونه‌ای که این غلاف‌ها سبز و عقیم می‌شوند و تمام قسمت‌های گیاهی از جمله برگ‌ها، دمبرگ‌ها و ساقه‌ها به طور کامل سبز باقی می‌مانند. این حالت نیز مشابه بالا شدیدترین وضعیت تظاهر این عارضه است و در این گونه مزارع نیز محصولی قابل برداشت نیست.

(۳) در برخی شرایط همان گونه که در بالا نیز به آن اشاره شد، برخی از گل‌ها به غلاف تبدیل می‌شوند و نهایتاً این غلاف‌ها به رسیدگی فیزیولوژیکی می‌رسند اما ساقه‌ها، برگ‌ها و دمبرگ‌ها سبز باقی می‌مانند. این وضعیت حالت خفیف‌تر عارضه اختلال در ناهنجاری غلاف بندی سویا است. محصول این گونه مزارع با اعمال برخی مدیریت‌های زراعی قابل برداشت است.

(۴) در حالت چهارم، تحت شرایط خاصی غلاف‌های بالغ مذکور در حالت سوم در روی ساقه‌های سبز که برگ و دمبرگ آن‌ها ریزش کرده است تشکیل می‌شوند. این وضعیت حالت خفیف‌تر عارضه ناهنجاری غلاف بندی سویا است که به سندروم ساقه سبز و نیز تاخیر در رسیدگی ساقه^۱ مشهور است. محصول این گونه مزارع با اعمال برخی مدیریت‌های زراعی قابل برداشت است. همچنین لازم به ذکر است که در حالت سوم و چهارم هرگاه به هر دلیلی برداشت محصول به تاخیر بیافتد غلاف‌ها

1- Delayed Stem Senescence

شکافته شده و دانه‌ها ریزش خواهد کرد و این وضعیت در زمان برداشت افزایش خواهد یافت و منجر به کاهش شدید عملکرد خواهد شد.

۲-۲- خسارت عارضه ناهنجاری غلاف بندی سویا

در جدول ۱-۲ آمار سطح زیر کشت، مقدار تولید و قیمت خرید تضمینی سویا در سال‌های ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۱ نشان داده شده است.^۱ میانگین سه ساله نشان می‌دهد که در استان گلستان در حدود ۵۶۰۰۰ هکتار تحت کشت سویا قرار گرفته است و عملکرد آن در هر هکتار در حدود ۱۸۰۰ کیلوگرم در هکتار بوده است. در جدول ۲-۲ تعداد بیمه گذاران، مساحت بیمه شده، تعداد مزارع و مساحت مبتلا به عارضه ناهنجاری غلاف بندی سویا و غرامت پرداخت شده از طریق مدیریت صندوق بیمه استان گلستان در سال‌های ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۱ نشان داده شده است (مدیریت صندوق بیمه استان گلستان، ۱۳۹۱).^۲

جدول ۱-۲: جدول مساحت زیر کشت، مقدار تولید و مبلغ خرید سویا در استان گلستان

سال	مساحت زیر کشت	تولید کل	تولید در هکتار	مبلغ خرید	ارزش محصول (ریال)
۱۳۸۹	۵۸۳۴۲	۱۲۰۰۰۰۰۰	۲۰۵۶/۸۴	۵۳۵۰	۱۱۰۰۴۰۷۹/۳۹
۱۳۹۰	۵۷۰۰۰	۸۲۰۰۰۰۰۰	۱۴۳۸/۶	۶۰۰۰	۸۶۳۱۵۷۸/۹۵
۱۳۹۱	۵۳۵۰۰	۱۰۵۰۰۰۰۰۰	۱۹۶۲/۶۲	۱۱۰۰۰	۲۱۵۸۸۷۸۵/۰۵
میانگین	۵۶۲۸۰/۶۷	۱۰۲۳۳۳۳۳۳/۳	۱۸۱۹/۳۵	۷۴۵۰	۱۳۷۴۱۴۸۱/۱۳

با توجه به جدول ۱-۲ و ۲-۲ آشکار است که در سال‌های مذکور که تنها ۷/۸۶ درصد از سطح زیر کشت سویا در استان گلستان تحت پوشش بیمه محصولات کشاورزی قرار گرفته است. میانگین

۱- سازمان جهاد کشاورزی استان گلستان- بخش دانه‌های روغنی

۲- داده‌ها از بانک کشاورزی استان گلستان- بخش مدیریت صندوق بیمه محصولات کشاورزی دریافت شد.

مساحت گیاهان مبتلا به عارضه ناهنجاری در طول این سال‌ها برابر ۱۶۴۵/۳۳ هکتار است که با درصدهای متفاوتی (۱۰-۱۰۰ درصد) به این عارضه مبتلا شدند و با توجه به تعهد صندوق بیمه برای هر هکتار (۳/۰۰۰/۰۰۰ ریال) می‌توان نتیجه گرفت که مساحت ۱۱۶۸/۵۷ هکتار از مزارع تحت پوشش بیمه‌ای به طور کامل (۱۰۰ درصد خسارت) خسارت دیده‌اند که ۲۶/۳۹ درصد از کل مساحت بیمه شده را شامل می‌شود. حال با تعمیم درصد حاصله (۲۶/۳۹ درصد) به میانگین کل مساحت زیر کشت سویا (جدول ۱-۲) آشکار می‌شود که در استان گلستان سالانه حدود ۱۵-۱۴ هزار هکتار به طور کامل به عارضه ناهنجاری غلاف بندی سویا مبتلا می‌شوند. با توجه به میانگین عملکرد و قیمت خرید تضمینی (جدول ۱-۲) روشن است که خسارت عارضه ناهنجاری غلاف بندی سویا در حدود ۲۰۰ میلیارد ریال است. بنابراین آشکار است که این ناهنجاری خسارت اقتصادی قابل توجهی را نه تنها به کشاورزان، بلکه به کشور، چرخه تولید و ... وارد می‌کند و این موضوع ضرورت انجام تحقیقات گسترده را به صورت گروهی که متشکل از متخصصین بخش‌های مختلف است را نشان می‌دهد.

جدول ۲-۲: جدول خسارت عارضه ناهنجاری غلاف بندی سویا در استان گلستان بر اساس اطلاعات بیمه‌ای.

سال	تعداد بیمه گذار	مساحت بیمه شده	مساحت علوفه شده	مبلغ پرداختی
۱۳۸۹	۲۱۷۹	۶۹۸۰	۱۸۷۰	۳۵۱۰۲۰۳۱۴۶
۱۳۹۰	۱۸۵۶	۴۸۴۲	۱۶۹۳	۴۰۸۳۲۶۱۲۹۶
۱۳۹۱	۷۵۸	۱۴۶۰	۱۳۷۳	۲۹۲۳۷۱۱۵۴۶
میانگین	۱۵۹۷/۶۷	۴۴۲۷/۳۳	۱۶۴۵/۳۳	۳۵۰۵۷۲۵۳۳۰

۲-۳- دلایل ایجاد ناهنجاری غلاف بندی سویا

در ایران در سال ۱۳۶۶ پروژه جامعی به مدت سه سال زراعی (۱۳۶۶ تا ۱۳۶۸) به منظور بررسی علل ایجاد این سندروم اجرا شد. بر اساس نتایج، تیمارهای به کار رفته در پروژه نتوانست

شرایط مشابه سندروم را در بوته‌های سویا به وجود آورد و فقط در نتایج مربوط به بخش بیماری‌ها، از بوته‌های آلوده سه ویروس استخراج گردید که احتمال می‌رفت عامل آلودگی بوته‌های سویا به این سندروم باشند (چراغعلی، ۱۳۶۷). در کشورهای خارجی نیز دلایل وقوع این سندروم به صورت نامعلوم باقی مانده بود (Morrison, 2009). در سال ۱۹۸۸ نمونه‌ای از سویای مبتلا به این سندروم جهت انجام تحقیقات به امریکا ارسال گردید. نتایج نشان داد که این گیاهان به بیماری مرموزی با دلایل ناشناخته مبتلا شده‌اند (Zelentsov and Ahmadi, 2002). در این رابطه دلایل متعددی پیشنهاد شده است که در زیر مورد بحث و بررسی قرار خواهند گرفت.

۲-۳-۱- فرضیه اقلیمی و اگرونومیکی

از عوامل احتمالی که منجر به ایجاد ناهنجاری غلاف بندی سویا می‌گردد، تغییرات اقلیمی مانند گرم شدن جهانی هوا (Hao et al., 2010)؛ تنش‌های محیطی مانند تنش‌های حرارتی (Zinn et al., 2010)، خشکی (Jaleel et al., 2009) و ... می‌باشند. تشکیل عارضه ناهنجاری غلاف بندی سویا در مزارع ممکن است با نوع خاک، توپوگرافی، آبیاری و بارش موضعی و شرایط خشکی موضعی در ارتباط باشد (Zelentsov and Ahmadi, 2002; Leonard et al., 2011). به عنوان مثال، عملیات خاکورزی شدید مثلاً شخم‌های عمیق منجر به ایجاد لایه اسفنجی شکل در ناحیه شخم خورده می‌گردد. این لایه اسفنجی باعث تغییرات سریع رطوبت خاک و در نتیجه بروز نوسانات شدید رطوبتی می‌گردد و مزرعه تحت تنش رطوبتی قرار می‌گیرد. این عمل ممکن است منجر به ریزش گل‌های اولیه شده و این فرآیند باعث ناهنجاری غلاف بندی سویا شود (Zelentsov and Ahmadi, 2002).

۲-۳-۱-۱- تنش حرارتی

حرارت‌های مناسب برای توسعه اندام‌های زایشی سویا بین ۲۲ تا ۳۰ درجه سانتیگراد گزارش شده است و در حرارت‌های بیش از ۳۰ درجه سانتیگراد تعداد گل و غلاف‌های سویا کاهش می‌یابد و

این فرآیند منجر به رشد و توسعه مجدد غلاف‌ها و بروز عارضه ناهنجاری غلاف بندی سویا می‌گردد (Raeisi *et al.*, 2013). در دمای کمتر از ۱۰ درجه سانتیگراد منجر به افزایش ریزش گل و در نتیجه کاهش تعداد غلاف در گیاه می‌گردد و دماهای سردتر منجر به توسعه گل‌های غیر طبیعی می‌گردد (Musser *et al.*, 1986).

۲-۳-۱-۲- تنش خشکی

تغییرات شدید رطوبتی خاک ممکن است یکی از مهمترین دلایل بروز عارضه ناهنجاری غلاف بندی سویا باشد. غالباً گیاهانی که پس از گلدهی تحت یک تنش خشکی و گرمای کوتاه مدت شدید یا طولانی مدت قرار می‌گیرند و در ادامه با یک دوره پر باران و شرایط محیطی مناسب مواجه می‌شوند، رشد مجدد خود را از سر می‌گیرند و به علت جوان شدن دوباره برگ‌ها و ساقه‌ها، گیاهان به عارضه نوع خفیفتر یعنی سندروم ساقه سبز یا تاخیر در رسیدن ساقه مبتلا می‌شوند. در این حالت غلاف‌ها زودتر به بلوغ می‌رسند ولی ساقه‌ها و برگ‌ها هرگز به بلوغ نمی‌رسند و میزان عملکرد محصول حداقل تا ۲۵ درصد کاهش می‌یابد (Morrison, 2009).

۲-۳-۲- فرضیه بیولوژیکی

آفات و بیماری‌های مختلفی نیز می‌توانند ساختار و عملکرد گیاه را تحت تاثیر قرار دهند و فرآیند رشد طبیعی گیاه را مختل کنند (Dhaliwal *et al.*, 2010). برخی از آفات و بیماری‌ها نیز ممکن است منجر به القای عارضه ناهنجاری غلاف بندی سویا گردند. ویروس‌هایی از جمله ویروس موزائیک غلاف لوبیا^۱ (Giesler *et al.*, 2002) و ویروس لکه حلقوی توتون^۲ (Egli and Bruening, 2000) ویروس رگه‌ای توتون^۳ (رحیمیان و همکاران، ۱۳۷۴) در بروز این سندروم نقش دارند. ویروس

1- Bean pod mottle virus (BPMV)

2-Tobacco ring spot virus (TRSV)

3- Tobacco Streak Virus (TSV)

TSV یکی از سه ویروسی است که توسط رحیمیان و همکاران (۱۳۷۴) به عنوان عامل احتمالی معرفی شده است که توسط تریپس پیاز^۱ که در تمام مناطق تحت کشت سویا انتشار دارد انتقال می-یابد. تغذیه آفاتی از جمله سن‌ها^۲، سنک‌ها (Boethel *et al.*, 2000) و سایر حشرات مکنده از عوامل احتمالی دیگری هستند که منجر به ایجاد سندروم سویای سبز می‌گردد (Hobbs *et al.*, 1980). تحقیقات انجام شده در برزیل در دهه ۱۹۷۰ نشان داده است که سن بند قرمز^۳ عامل تاخیر در رسیدگی سویا است (Vyavhare, Way, Pearson, *et al.*, 2015) و یا به نوعی عامل سندروم سویای سبز است.

۲-۳-۳- فرضیه فیزیولوژیکی

دلایل اختصاصی وقوع عارضه ناهنجاری غلاف بندی سویا از سالی به سال دیگر و از مکانی به مکانی دیگر متفاوت است. اما در بیشتر حالات این عارضه در مرحله رشد و توسعه گل‌ها، غلاف‌ها و بذرها با تنش‌های زنده و غیر زنده گیاهی در ارتباط است (Holshouser, 2009). با دانش درباره فرآیند رسیدگی فیزیولوژیک می‌توان توضیحات بهتری برای دلایل به وجود آمدن این عارضه بیان کرد. به هر حال، در رابطه فرضیه فیزیولوژیکی، فرضیه‌های متعددی بیان شده است. فرضیه "خود تخریبی"^۴ یکی از فرضیه‌های ارائه شده درباره این سندروم است. این فرضیه فرآیندی را تشریح می-کند که در آن پروتئین‌ها تجزیه می‌شوند و به بذرهایی که در حال رشد سریع هستند انتقال می‌یابند. همچنین رابطه مخزن و منبع^۵ اولین تئوری مرتبط با این سندروم است (Morrison,)

1- Thrips tabacci

2- Stink bugs

3- Redbanded Stink Bug

4- Self destructive

5- Sink and Source Relationship

2009؛ Holshouser, 2009؛ Egli and Bruening, 2006). پتانسیل بالقوه تنش‌های زیستی و غیر زیستی در ریزش شدید گل‌ها و غلاف‌ها است که نتیجه آن تغییر نسبت منبع به مخزن در گیاه است. کاهش اندازه مخزن و افزایش اندازه منبع بخصوص تحت شرایط رویشی مناسب در انتهای فصل رشد، انتقال کربن و نیتروژن از اندام‌های رویشی به زایشی را کاهش می‌دهد و این فرآیند نهایتاً منجر به القای این سندروم می‌گردد (Wittenback, 1983؛ Miceli et al., 1995).

۲-۳-۴- فرضیه ژنتیکی

در فرضیه ژنتیکی ذکر شده است که واریته‌های مختلف سویا در تظاهر سندروم سویای سبز از همدیگر متفاوت هستند و در برخی واریته‌ها تظاهر سندروم سویای سبز دارای منشأ ژنتیکی می‌باشد (Jadhav et al., 2013؛ Leonard et al., 2011). همچنین، نر عقیمی چه از نوع سیتوپلاسمی و چه از نوع هسته‌ای منجر به عدم باردهی گیاه می‌گردد (Ding et al., 2002). اصلاح ژنتیکی سویا و تولید سویای مقاوم به این عارضه یکی از محورهای اصلی تحقیقات اصلاحگران و مهندسين ژنتیک خواهد بود. آخرین گزارش اینکه دلایل ایجاد این سندروم به طور دقیق مشخص نشده است و محققان می‌بایستی دلایل این ناهنجاری را مورد توجه و بررسی قرار دهند (Jadhav et al., 2013؛ Grau, 2013؛ Raeisi et al., 2013).

به هر حال، دلایل سندروم سویای سبز، از واکنش گیاه نسبت به فاکتورهای مختلف ذکر شده منجر می‌گردد و به نظر می‌رسد که صرفنظر از دلایل مختلف، پروتئین‌های مختلف در گیاه تغییر می‌یابد. بنابراین، بررسی پروتئوم گیاه با استفاده از رهیافت پروتئومیک یکی از راهکارهای تشخیص پروتئین‌های درگیر در این سندروم در سطح مولکولی می‌باشد.

۴-۲- رهیافت پروتئومیک در سویا

بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که تا کنون در زمینه سندروم سویای سبز مطالعات گسترده‌ای از طریق تکنولوژی پروتئومیک صورت نگرفته است. این رهیافت با شناسایی پروتئین‌های درگیر در تظاهر سندروم سویای سبز کمک می‌کند تا ساز و کار تحمل به سندروم سویای سبز در سطح مولکولی مورد بررسی قرار گیرد و درک بهتری از پاسخ گیاه به این سندروم حاصل شود. در پاسخ به تنش‌های مختلف، بیان برخی ژن‌ها افزایش یا کاهش می‌یابد. تغییر بیان ژن‌ها در گیاهان به وسیله تنش‌های مختلف، باعث تغییر پروتئین‌های خاص ساختاری یا آنزیمی و یا میزان فعالیت آنها در مسیرهای متابولیکی خاص می‌گردد (Seki et al., 2003). پروتئومیک ابزار قدرتمندی برای مطالعه تغییرات بیان پروتئین‌های مختلف در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی است (Xing et al., 2002). پروتئومیک نقش محوری را در بیولوژی سیستم‌ها ایفا می‌کند. زیرا تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم را کامل می‌کند. از آنجایی که بیان ژن‌ها در مراحل مختلفی تنظیم می‌شود پیشگویی میزان پروتئین‌های یک سلول از روی مقدار mRNA به ویژه در مورد پروتئین‌های نادر کار دشواری است. همچنین تجمع پروتئین‌هایی که در ترانسایپ پیام درگیر هستند دستخوش تغییرات پس از رونویسی و پس از ترجمه می‌شوند. دقت و حساسیت این روش مبتنی بر استفاده از الکتروفورز دو بعدی، تجزیه کمی لکه‌های پروتئینی، لکه‌گذاری و شناسایی پروتئین‌ها به وسیله توالی یابی یا طیف سنجی جرمی است. تحقیقات پروتئومیک متعددی از جنبه‌های مختلف در سویا انجام شده است که به تعدادی از آنهایی که در بافت ریشه صورت گرفته، در زیر اشاره می‌شود.

۴-۵- پروتئومیک ریشه سویا

تورچی و همکاران (Toorchi et al., 2009) مکانیسم پاسخ سویا به تنش اسمزی در تیمار با پلی اتیلن گلیکول را مورد بررسی قرار دادند. تجزیه لکه‌های پروتئینی ریشه با الکتروفورز دو بعدی نشان داد، ۳۷ پروتئین از ۴۱۵ پروتئین شناسایی شده که با روش توالی یابی ادمن و انگشت نگاری

توده‌ای پپتیدی تغییر می‌یابند، متعلق به گروه پروتئین‌های مرتبط با بیماری/دفاع بودند. بر اساس نتایج آنها در شرایط تنش اسمزی در مراحل اولیه رشد میزان کافنوئیل-کوا-او-متیل ترانسفراز که در چوبی شدن نقش دارد به عنوان یک پاسخ سازگاری کاهش ولی میزان زیر واحد A از آلفا پروتئازوم ۲۰ اس که در کاهش آسیب‌های ناشی از تنش اکسایشی نقش دارد، افزایش می‌یابد.

محمدی و همکاران (Mohammadi et al., 2012) گیاهچه‌های سه روزه سویا را تحت تیمار تنش خشکی، پلی اتیلن گلیکول ۱۰ درصد و ترکیبی از آن دو قرار دادند. پس از اعمال تیمار، پروتئین‌های بافت برگ، هیپوکوتیل و ریشه استخراج شد و سپس در ژل‌های دو بعدی، الکتروفورز شدند. آنها گزارش کردند که ریشه حساس‌ترین اندام در پاسخ به تنش خشکی است به طوری که در تیمار تنش خشکی، پلی اتیلن گلیکول ۱۰ درصد و ترکیبی از آن دو به ترتیب ۳۲، ۱۳ و ۱۲ نوع پروتئین به طور متمایزی بیان شدند. در این آزمایش سنتز پروتئین‌های مرتبط با متابولیسم گیاه افزایش یافت و پروتئین‌های مرتبط با تولید انرژی و نیز پروتئین‌های سنتزی کاهش یافت (Mohammadi et al., 2012).

آلم و همکاران (Alam et al., 2010) تغییرات پروتئوم ریشه سویا که تحت تنش خشکی کوتاه مدت قرار داشت را با استفاده از رهیافت پروتئومیک مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که تعداد ۴۵ پروتئین به طور معنی‌داری تغییر بیان داشتند. از بین این پروتئین‌ها مشخصات ۲۸ پروتئین با استفاده از طیف سنجی جرمی تعیین گردید به طوری که از بین این ۲۸ پروتئین، بیان ۵ لکه پروتئینی افزایش داشت و بیان ۲۱ لکه پروتئینی کاهش یافت و ۲ لکه پروتئینی نیز به عنوان لکه پروتئینی جدید شناخته شدند.

نانجو و همکاران (Nanjo et al., 2013) با استفاده از روش پروتئومیک، پروتئین‌های مرتبط با تحمل به تنش غرقابی در گیاهچه‌های سویا را مطالعه کردند. برای این منظور، گیاهچه‌های سویا طی سه روز تحت تیمار غرقابی قرار گرفتند و سپس از گیاهان نمونه برداری و استخراج پروتئین انجام شد.

در این مطالعه پروتئین‌ها به گروه‌های درگیر در تغییر دیواره سلولی مانند پروتئین‌های شبه بازدارنده پلی گالاکتوروناز و پروتئین شبه B1 بسط دیواره سلولی طبقه بندی شدند که احتمالاً در سیستم دفاعی گیاه درگیر باشند. همچنین تغییرات پروتئینی در ریشه‌ها نیز مشاهده شد که از جمله آن پروتئین‌های شبه زیر واحد 2A پروتئین فسفاتاز بودند که احتمالاً در مرگ سلول‌های نوک ریشه درگیر هستند. از طرفی تجزیه و تحلیل پروتئین‌ها نشان داد که فراوانی پروتئین‌های درگیر در سنتز دیواره سلولی از جمله سینامیل الکل دهیدروژناز در طی سه روز بعد از غرقابی کاهش یافته است.

کوماتسو و همکاران (Komatsu *et al.*, 2013) اثر آبسیزیک اسید در سویای تحت تنش غرقابی را با رهیافت پروتئومیک مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. هنگامی که گیاهان سویای دو روزه غرقاب شدند، محتوی آبسیزیک اسید در ریشه گیاهان شاهد کاهش یافت. هنگامی که آبسیزیک اسید در مدت تیمار غرقاب به گیاه اضافه شد نسبت بقاء در مقایسه با سویاهای غرقاب شده بدون تیمار آبسیزیک اسید بهبود یافت. نتایج نشان داد که فراوانی ۳۴ پروتئین هسته‌ای از قبیل هیستون داستیلاز و ریبونوکلئوپروتئین هسته‌ای کوچک U2 در تیمار غرقابی همراه با کاربرد آبسیزیک اسید افزایش یافت. همچنین فراوانی ۳۵ پروتئین هسته‌ای از جمله ایمپورتین آلفا، فاکتور تغییر حالت کروماتین، پروتئین‌های انگشت روی، ترانسداکتین و ۵ پروتئین تقسیم سلولی کاهش یافت.

سالواتیا و همکاران (Salavatia *et al.*, 2012) تغییرات پروتئومیک در ریشه گیاهچه‌های سویای بازیابی شده پس از تنش غرقابی را مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. تجزیه مقایسه‌ای ژل‌های الکتروفورز دو بعدی تیمار شاهد و ریشه گیاهچه‌های سویای بازیابی شده پس از سه روز غرقابی، تعداد ۷۰ لکه پروتئینی با بیان متفاوت را از کل ۸۰ پروتئین شناسایی شده نشان داد. تعدادی از این پروتئین‌های بازیابی شده در فرآیندهای متابولیکی و ذخیره/تقسیم پروتئین‌ها درگیر هستند. تجزیه کلاستر مبتنی بر پروفایل ۷۰ پروتئین با بیان متمایز نشان داد که سه روز غرقاب و حتی در مدت سه روز پس از غرقابی تغییرات معنی داری در بیان پروتئین‌ها دارد. از طرفی، سه روز غرقاب گیاهچه‌های

دو روزه سویا منجر به تنظیم پایین دست پروتئین‌های مرتبط با انتقال یون و تنظیم بالادست پروتئین‌های درگیر در سازماندهی مجدد اسکلت سلولی، توسعه سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌گردد. علاوه بر این، تعداد ۷ لکه پروتئینی درگیر در تغییر دیواره سلولی و سنتز S-آدنوزین متیونین در ریشه گیاهچه‌های سویای بازیابی شده پس از مدت یک روز غرقاب ردیابی شد.

۲-۶- پروتئومیک برگ سویای دارای ناهنجاری غلاف بندی

پیغام‌زاده و همکاران الگوی پروتئینی برگ سویای دارای ناهنجاری غلاف بندی را در دو رقم کتول و گرگان ۳ مورد بررسی قرار دادند. الکتروفورز دو بعدی با رنگ آمیزی به روش آبی کماسی و تجزیه و تحلیل نقاط پروتئینی با استفاده از نرم افزار PDQuest منجر به شناسایی ۱۵۵ لکه در رقم کتول و ۱۴۳ لکه در رقم گرگان ۳ گردید. کمیت (حجم) لکه‌های مشابه توسط نرم افزار محاسبه شد و آزمون t- استیودنت برای شناسایی لکه‌هایی با افزایش و یا کاهش بیان معنی‌دار استفاده گردید. برای افزایش دقت و انتخاب پروتئین‌هایی با تغییرات قابل ملاحظه از نظر بیان، لکه‌های پروتئینی با عامل القای (IF) بزرگتر یا مساوی ۲ با افزایش بیان و لکه‌هایی با IF کوچکتر یا مساوی ۰/۵ با کاهش بیان تحت ابتلا به ناهنجاری غلاف بندی سویا در نظر گرفته شد. به عبارتی دیگر پروتئین‌هایی با افزایش بیان و یا کاهش بیان دو برابر یا بیشتر برای شناسایی پروتئین‌ها انتخاب شدند. از بین این پروتئین‌ها ۵ لکه در رقم کتول و ۱۱ لکه در رقم گرگان ۳ به طور معنی‌دار تغییر بیان داشتند.

داده‌های حاصل از طیف سنجی جرمی به روش nESI-LC-MS/MS برای جستجو در پایگاه داده‌های پروتئین Uniport مورد استفاده قرار گرفت و ۳ لکه پروتئینی در رقم کتول و ۹ لکه پروتئینی در رقم گرگان ۳ به طور اطمینان بخشی مورد شناسایی قرار گرفت. از بین این تعداد پروتئین‌ها در هر دو رقم کتول و گرگان ۳ یک لکه پروتئینی افزایش بیان داشت در حالیکه تعداد لکه‌هایی که سطح آن‌ها در این دو رقم کاهش بیان داشتند به ترتیب ۴ و ۱۰ لکه پروتئینی بود.

این پروتئین‌ها بر اساس عملکرد بیولوژیکی به پنج گروه طبقه بندی شدند. در این طبقه بندی، زیر واحد بزرگ ریبولوز ۱-۲ بیس فسفات کریوکسیلاز/ اکسیژناز، Oxygen- evolving enhancer protein 2، کربنیک آنهیدراز، زیر واحد آلفا پروتئین اتصال به زیر واحد بزرگ رابیسکو در گروه پروتئین‌های دخیل در تولید انرژی، آنزیم رابیسکو اکتیواز، گلوتامات دهیدروژناز و ملات دهیدروژناز در گروه پروتئین‌های متابولسمی، گلیکوپروتئین ۳۱ کیلو دالتونی ساقه‌ای در گروه پروتئین دخیل در تقسیط و ذخیره سازی پروتئین، 14-3-3-Like protein در گروه پروتئین‌های دخیل در انتقال سیگنال و چهار پروتئین در گروه پروتئین‌های ناشناخته قرار گرفت.

در میان پروتئین‌های شناسایی شده، پروتئین‌های 14-3-3-Like protein، OEE2، NACA و زیر واحد بزرگ رابیسکو با احتمال از جمله تنظیم کننده‌های کلیدی عارضه ناهنجاری غلاف بندی بودند (Payghamzadeh et al., 2017).

فصل سوم

مواد و روش‌ها

این آزمایش در دو مرحله نمونه گیری و انجام الکتروفورز دوبعدی انجام شد. در مرحله اول مزارع تحت کشت سویا در استان گلستان مورد بازدید قرار گرفت. از گیاهان سالم و مبتلا به ناهنجاری غلاف بندی سویای به صورت تصادفی نمونه گیری شد و در مرحله دوم، نسبت به استخراج پروتئین از اندام ریشه‌ی گیاهان سالم و مبتلا به این ناهنجاری اقدام شد.

۳-۱- سویا رقم کتول (DPX)

این رقم دارای بوته‌هایی با ارتفاع بلند، تعداد گره به طور میانگین ۱۸ عدد، رنگ گل بنفش و رنگ کرک طلائی، رنگ غلاف طلائی، تیپ رشد نیمه محدود بوده و فرم برگ‌ها به صورت پهن و شاخه بندی به صورت چند شاخه‌ای روی یک بوته، رنگ بذر زرد روشن، رنگ ناف سیاه تیره، درصد روغن دانه به طور میانگین ۲۰ درصد و پروتئین ۳۹ درصد می‌باشد. فاصله اولین غلاف از زمین ۲۲ سانتی‌متر، وزن صد دانه ۲۲۰-۲۰۰ گرم، عملکرد در هکتار ۴ تن، میزان بذر مصرفی در هکتار ۵۰ کیلوگرم و تراکم بوته ۲۰۰ هزار بوته در هکتار، الگوی کاشت ۸×۵۰ سانتی‌متر و عمق کاشت ۶-۵ سانتی‌متر در نظر می‌باشد (هزارجریبی، ۱۳۸۷).

۳-۲- نمونه گیری

از بافت ریشه گیاهان سالم و مبتلا به سندروم سویای سبز رقم کتول (به ترتیب شکل ۲-۱- الف و ب)، با سه تکرار (بیولوژیکی) به صورت جداگانه نمونه گیری انجام شد. در انتخاب نمونه‌های گیاهی برای تجزیه پروتئوم سعی شد که نمونه‌های مورد نظر از هر نقطه‌ای که دارای گیاهان سالم و مبتلا به این سندروم بودند و نیز تا حد امکان در فاصله نزدیکی از یکدیگر قرار گرفته بودند، استفاده شود. سپس نمونه‌ها پس از شستشوی کامل در فویل‌های نشاندار شده به صورت جداگانه قرار گرفتند و بلافاصله در داخل فلاسک حاوی ازت مایع قرارداده شدند. نمونه‌های گیاهی در کمترین زمان در

ازت مایع به آزمایشگاه منتقل و در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس تا زمان استخراج پروتئین نگهداری شدند.



شکل ۳-۱- نمونه ریشه سویای سالم (الف) و نمونه مبتلا به ناهنجاری غلاف بندی (ب)

۳-۳- الکتروفورز دو بعدی

برای انجام الکتروفورز دو بعدی ابتدا استخراج پروتئین^۱ صورت گرفت و با تهیه ژل بعد اول (محلول IEF)، تهیه ژل بعد دوم، رنگ آمیزی، اسکن ژل، تجزیه کمی ژل با نرم افزار PDQUEST کار به انجام رسید (شکل ۳-۳).

۳-۳-۱- استخراج پروتئین

از ریشه‌ی گیاهان سویای سالم رقم کتول و مبتلا به سندروم سویای سبز با سه تکرار بیولوژیکی برای تجزیه پروتئوم استفاده گردید. پروتئین‌ها از ریشه‌های جانبی به دلیل نرم تر بودن نسبت به ریشه اصلی استخراج شدند. برای این کار ظرف یونولیتی حاوی یخ با فویل آلومینیومی پوشانده شد. سپس نمونه‌های ریشه را از ۸۰- درجه سلسیوس خارج کرده و مقدار یک گرم از نمونه هر واحد آزمایشی به هاون منتقل شد. از این مرحله به بعد بلافاصله هاون روی فویل آلومینیومی در

1- Protein Extraction

تماس با یخ قرار گرفت و تا چند مرحله قبل از انتهای استخراج پروتئین کلیه عملیات در این شرایط انجام شد. یک میلی لیتر بافر فسفات (PBS)^۱ (محتوی K_2HPO_4 : ۶۵mM ، KH_2PO_4 : ۲/۶ mM ، NaCl : ۴۰۰ mM و NaN_3 : ۳ mM و pH : ۷/۶) به نمونه ریشه‌ی داخل هاون به همراه مقدار کمی شن کوارتز (به منظور خرد کردن آسانتر نمونه‌ها) اضافه گردید و سپس ریشه‌ها با هاون له شدند. سپس فویل به اندازه تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری سوراخ شد و تیوب‌ها درون یخ جا داده شدند. بعد از این مرحله، محتوی هاون با سر سمپلر به تیوب‌ها منتقل شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و با دور ۱۵۰۰g (۱۱۲۰۳^۲rpm) سانتریفوژ گردیدند. در این فاصله تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری دیگری و همچنین محلول ۵۰٪ TCA ^۳ روی یخ قرار داده شدند تا برای مراحل بعدی آماده شوند. پس از اتمام سانتریفوژ سوپرناتانت (رو شناور) تیوب‌ها به تیوب دیگری منتقل شد و دوباره سانتریفوژ با همان تنظیم‌های بالا انجام گرفت. سوپرناتانت حاصل به تیوب دیگری منتقل گردید. با در نظر گرفتن حجم سوپرناتانت بدست آمده حجم معینی از ۵۰٪ TCA با توجه به مقدار سوپرناتانت حاصله و به طوری که حجم نهایی TCA در محلول نهایی ۱۰٪ باشد، اضافه و ورتکس شد. برای مثال برای ۱۲۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت ۳۰۰ میکرولیتر از ۵۰٪ TCA به آن افزوده شد. تیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه داخل یخ قرار داده شدند و توسط فویل آلومینیومی پوشانده شدند. سپس تیوب‌ها دوباره ورتکس شدند و سانتریفوژ با همان تنظیمات بالا صورت گرفت. پس از سانتریفوژ، سوپرناتانت دور ریخته شد و ۲۰۰ میکرولیتر اتانول خالص سرد به رسوب اضافه شد و محلول برای مدت کوتاهی ورتکس گردید و سپس به مدت ۲ دقیقه با تنظیمات بالا سانتریفوژ شد. دوباره سوپرناتانت دور ریخته

1- Phosphate Buffer Solution

2- Revolutions per minute

3-Trichloroacetic Acid

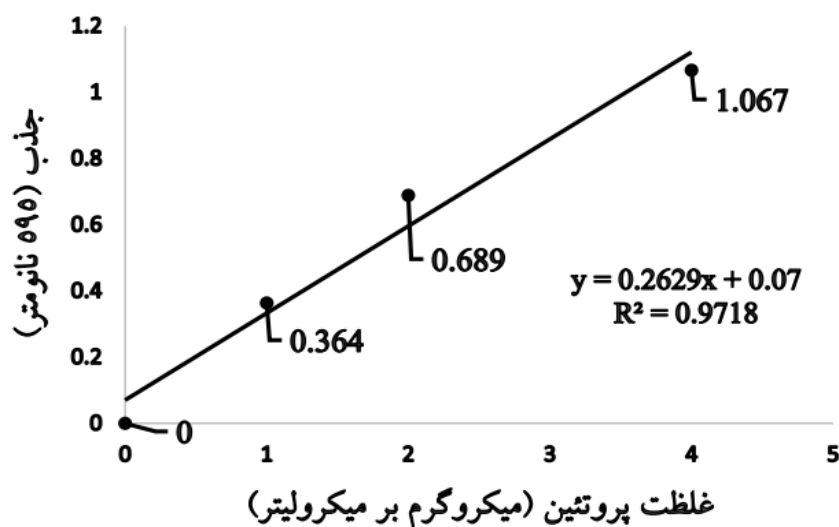
شد و همین عملیات ۳ بار دیگر تکرار شد. در این مدت بافر حلال^۱ (۲۰- درجه سلسیوس) پس از خروج از حالت یخزدگی ورتکس گردید. بعد از سانتریفوژ، سوپرناتانت دور ریخته شد و رسوب باقی مانده در ته اپندروفها با استفاده از قاشقک به هاونهای مخصوصی که اندازه آنها از هاون مرحله اول کوچکتر بودند منتقل شد. برای هر نمونه هاون جداگانه‌ای استفاده شد. بعد از خشک شدن رسوب حاصله، پودر بدست آمده به تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شده و مقدار ۱۹۰ میکرولیتر بافرلیز (محتوی ۵/۱ g Urea، ۱/۹ g Thiourea، ۰/۵ g Chaps، ۲۰۰ μL Triton-x100، ۰/۱۵ g DTT و ۰/۱ mL Ampholine 3-10 که با اضافه کردن آب دیونیزه به حجم نهایی ۱۰ mL می‌رسد) به آن اضافه شد. سپس با میله‌ی شیشه‌ای ۵ دقیقه هم زده شد تا همگن شود. از این مرحله به بعد نیازی به انجام کار روی یخ نبود چون بافر حلال دارای اوره است و در دمای پایین به صورت پودر سفید در می‌آید. پس از حل کردن رسوب، عمل سانتریفوژ با تنظیم ۲۰ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سوپرناتانت حاصله به تیوب‌های ۱/۵ میکرولیتری منتقل شد و مجدداً سانتریفیوژ با همان تنظیم انجام گردید. سپس در یک تیوب دیگر مقدار ۲۰ میکرولیتر بافر حلال به ۲۰ میکرولیتر آب دیونیزه افزوده شد و بعد از ورتکس کردن، بافر حلال^۲ ۱/۲ بدست آمد.

1- Lysis Buffer

2- Half Lysis Buffer

۳-۳-۲- تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد

برای این منظور از سرم آلبومین گاوی در غلظت‌های متفاوت برای استاندارد سازی روش برادفورد (Bradford, 1976) استفاده گردید. جهت استاندارد سازی از میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی-لیتری استفاده شد و ۷۹۵ میکرولیتر آب دیونیزه، ۲۰۰ میکرولیتر محلول برادفورد و ۵ میکرولیتر از سرم آلبومین و پس از چند ثانیه تکان دادن، درون دستگاه اسپکتروفتومتر قرار گرفت و میزان جذب هر یک از غلظت‌ها تعیین شد. به طوری که در مقادارهای ۰، ۱، ۲، ۴ میکرولیتر به ترتیب میزان جذب در ۵۹۵ نانومتر ۰، ۰/۳۶۴، ۰/۶۸۹ و ۱/۰۶۷ بدست آمد. از طریق نرم افزار اکسل^۱ معادله خطی این داده‌ها بدست آمد و سپس نمونه پروتئینی مورد نظر به میزان ۵ میکرولیتر برای تعیین غلظت استفاده شد، با قرار دادن عدد دستگاه اسپکتروفتومتر در معادله خط، میزان پروتئین برای بارگذاری تعیین گردید.



شکل ۳-۲- غلظت‌های استاندارد سازی نمونه‌های پروتئینی

1- Excel

۳-۳-۳- تهیه ژل بعد اول (محلول IEF)

برای تهیه دو ژل IEF، ۱/۲ گرم اوره در داخل بشر ریخته شد و ۲۹۰ میکرولیتر از پلی آکریل آمید ۳۰٪، ۵۰۰ میکرولیتر NP-40 و ۷۱۰ میکرولیتر آب ddH₂O (دیونیزه) به آن اضافه شد. این مواد برای بهتر حل شدن در آب گرم با دمای کمتر از ۶۰ درجه سلسیوس به طوریکه که دست را نسوزاند، قرار داده شدند. پس از حل شدن اوره در محلول حاصل و سرد کردن آن، آمفولین‌ها به آن اضافه شدند. pH آمفولین‌های استفاده شده ۸-۵ و ۱۰-۳ بودند. قبل از اضافه کردن ^۱APS 10 % و ^۲TEMED همه وسایل مورد نیاز از قبیل میکروپیپت‌ها، سرنگ و لوله‌های شیشه‌ای بعد اول آماده شدند و لوله‌ها در قسمت فوقانی، به اندازه ۲ سانتی متر علامت گذاری شده و ته آن‌ها با پارافیلیم بسته شد. مقدار ۳/۷۵ میکرولیتر 10% APS و ۲/۵ میکرولیتر TEMED به محلول قبلی اضافه گردید و بشر به آرامی تکان داده شد. سپس محلول توسط سرنگ به داخل لوله‌ها تا خط نشانه منتقل گردید. روی محلول ریخته شده در داخل لوله‌ها مقدار ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه شد تا محلول در مجاورت مستقیم با هوا قرار نگیرد و اکسید نشود. سرنگ بلافاصله با آب شستشو داده شد تا داخل سرنگ پلیمریزه نشود و برای استفاده مجدد آماده گردد. مدت یک ساعت برای پلیمریزاسیون کافی بود. از آنجایی که درصد این ژل‌ها ۳/۵ است و در صورت کمتر بودن زمان، خوب پلیمریزه نشده و در طول الکتروفورز و مراحل نهایی حباب‌هایی بین ژل و شیشه ظاهر می‌شد، بنابراین ۳-۴ ساعت در عدم مجاورت نور قرار گرفت تا پلیمریزاسیون انجام شود.

1- Ammonium persulfate

2- Tetraethylemethylenediamine

۳-۳-۴- الکتروفورز بعد اول (IEF)

در این مرحله با استفاده از دستمال کاغذی آب اضافه شده به لوله‌های محتوی محلول IEF خشک گردید. پس از آن پارافیلیم انتهای لوله‌های بعد اول باز شده و لوله‌ها روی بخش بالایی دستگاه بعد اول به نحوی که انتهای لوله‌ها مماس با بخش پایینی باشد، سوار شدند. پروتئین استخراج شده به مقدار $390 \mu\text{g}$ برروی ژل‌های بعد اول بارگذاری شد. بر روی پروتئین بارگذاری شده ۲۰ میکرولیتر بافرحلال با غلظت نصف اضافه شد تا از تماس محلول پروتئینی با NaOH قسمت بالایی آپاراتوس جلوگیری شود. انتهای لوله‌ها با NaOH ۰/۰۲ نرمال پر شد. سپس در قسمت پایین آپاراتوس بعد اول اسیدفسفریک ریخته شد لوله‌ها تا اندازه یک میلی‌متری کف آپاراتوس پایین آورده شد و ثابت گردید در قسمت بالایی آن نیز بعد از مسدود کردن سوراخ‌های باقی مانده NaOH ۰/۲ نرمال ریخته شد. برای جلوگیری از چکه کردن محلول از بخش بالایی به پایینی دستگاه، در هنگام اضافه نمودن محلول یک دستمال زیر بخش بالایی نگه داشته شد. بعد از انجام این عملیات، دستگاه بعد اول به منبع برق متصل شد. الکتروفورز بعد اول در سه مرحله به ترتیب ۲۰۰ ولت به مدت نیم ساعت، ۴۰۰ ولت به مدت ۱۶ ساعت و ۶۰۰ ولت به مدت یک ساعت صورت گرفت.

۳-۳-۵- الکتروفورز بعد دوم (SDS-PAGE)

حدود نیم ساعت قبل از اتمام بار گذاری ژل‌های بعد اول، ژل‌های بعد دوم تهیه شدند. ژل بعد دوم به صورت دو قسمتی شامل ژل تجمعی یا نگه‌دارنده^۱ در قسمت بالا و ژل تفکیکی یا جدا کننده^۲ در قسمت پایین است. شیشه‌های مخصوص دستگاه الکتروفورز بعد دوم از فاصله ۲/۵ سانتی متری لبه علامت‌گذاری شد و سپس کش‌های سیلیکونی را دور شیشه‌ها قرار داده و با گیره به یکدیگر

1- Stacking Gel

2- Separating Gel

وصل شدند. ۱۷ میلی لیتر آکریل آمید برای ژل جدا کننده با پیپت در داخل بشر ریخته شد سپس ۱۲/۶ میلی لیتر بافر ژل جدا کننده با pH ۸/۸ (محتوی g ۶۰/۵۵ : تریس و g ۱/۳۵ : SDS که با آب دیونیزه به حجم نهایی mL ۵۰۰ رسید)، ۴ میلی لیتر آب دیونیزه، ۲۴۰ میکرولیتر 10%APS و سرانجام ۴۰ میکرولیتر TEMED به محلول های موجود در بشر اضافه شد و بعد از تکان دادن تا خط ۲/۵ سانتی متری از بالای شیشه های مخصوص دستگاه الکتروفورز ریخته شدند. بلافاصله روی ژل ها با یک میلی لیتر آب دیونیزه پر شدند، تا در معرض اکسیژن هوا قرار نگیرد. پلیمریزاسیون حدود ۴۵ دقیقه طول کشید.

ژل های IEF با استفاده از سرنگ شیشه ای و فشار آب دیونیزه از درون شیشه های استوانه ای بیرون آورده شدند. سپس ژل های IEF توسط پنس به داخل شیشه های درب دار مخصوص به صورت جداگانه منتقل شدند و در داخل آنها حدود ۱۵ میلی لیتر SDS sample buffer (محتوی g ۳/۷۸۵ : تریس، g ۱۲/۵ : SDS، mL ۲۵ مرکاپتواتانول و mL ۵۰ : گلیسرول در حجم نهایی mL ۵۰۰ با آب دیونیزه) ریخته شد و شیشه ها بعد بستن درب آن ها بر روی شیکر به صورت افقی به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت تا با سرعت متوسط تکان داده شود. در این مدت ژل تجمعی یا نگهدارنده شامل ۲ میلی - لیتر آکریل آمید برای ژل نگهدارنده، ۶ میلی لیتر بافر ژل نگهدارنده، ۴ میلی لیتر آب دیونیزه تهیه شد. قبل از اضافه کردن 10%APS و TEMED آب قسمت بالایی ژل ها با استفاده از دستمال کاغذی و با کج کردن شیشه ها خشک شد. سپس ۶۰ میکرولیتر 10%APS و ۴۰ میکرولیتر TEMED به محلول قبلی اضافه شد. برای ریختن مایعات به بشر از دستگاه مکنده اتوماتیک استفاده گردید و برای هر ماده از پیپت جداگانه ای استفاده شد. ژل نگهدارنده روی ژل های جدا کننده تا انتهای شیشه ریخته شد به طوری که در گوشه سمت چپ یه خط اریب مانند تشکیل شود. زمان مورد نیاز برای پلیمریزاسیون ۱۵-۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. ژل نگهدارنده دارای غلظت ۵٪ و وضوح ۱۵٪ بود. برای این ژل نیاز به اضافه کردن آب برای پلیمریزاسیون نیست.

بعد از آن، ژل IEF را درون سینی استیل خالی کرده و دوباره این ژل‌ها با پنس به داخل شیشه خالی گذاشته شد. مجدداً ۱۵ میلی‌لیتر بافر SDS به آن افزوده شد و دوباره به مدت ۱۵ دقیقه دیگر روی شیکر^۱ تکان داده شد. در این مدت ژل آگارز یک درصد بر روی هیتز قرار گرفت تا ذوب شود. و بروموفنول‌بلو (BPB^۲) نیز روی شیکر قرار داده شد. وقتی ژل‌های بعد اول برای بارگذاری بر روی بعد دوم آماده گردید، در داخل سینی ریخته شدند. قبل از انتقال ژل IEF مقداری آگارز ذوب شده بر روی ژل نگهدارنده اضافه شد و سپس ژل‌های IEF با استفاده از پنس بر روی صفحه‌ی پلاستیکی مخصوص قرار گرفت و بر روی ژل نگهدارنده بعد دوم سوار شد. سپس روی ژل IEF مستقر شده روی ژل نگهدارنده مقداری آگارز ذوب شده ریخته شد تا ژل به طور کامل ثابت شود. وقتی ژل IEF بر روی ژل بعد دوم به این روش تثبیت شد، شیشه‌ها روی دستگاه بعد دوم قرار داده شدند. قبل از قرار گیری شیشه‌ها روی دستگاه بعد دوم گیره‌ها و کش پلاستیکی شیشه‌های بعد دوم باز شد قبل از سوار کردن محفظه پایینی دستگاه با بافر مخصوص بعد دوم SDS- PAGE running buffer (محتوی ۷/۵ g: تریس، ۳۶ g: گلیسین و ۲/۵ g: SDS در حجم نهایی ۲/۵ لیتر با آب دیونیزه) تا نصف مخزن به آرامی پر شد تا بافر کف نکند. سپس شیشه‌ها طوری در دو طرف دستگاه قرار داده شدند که هم سطح با کناره‌های آن باشند و ژل‌ها به سمت داخل و روبروی هم واقع شوند. فضای بین دو ژل تا روی ژل‌ها با بافر ذکر شده پر گردید. برای دو ژل به میزان ۴۰۰ میکرولیتر (۲۰۰ میکرولیتر به ازای هر ژل) نشانگر آبی بروموفنول با سمپلر در بافر داخل محفظه بین دو شیشه ریخته شد تا میزان حرکت جهت کنترل رسیدن اولین لکه پروتئینی به انتهای ژل و توقف عملیات الکتروفورز مشخص شود. دستگاه به منبع برق وصل گردید و عملیات رانش با جریان ثابت ۷۰ میلی‌آمپر (۳۵ میلی‌آمپر برای هر ژل) و

1- Shaker

2- Bromophenol blue

مدت زمان ۳ ساعت تا رسیدن نشانگر آبی به انتهای ژل جداکننده برقرار گردید. پس از حدود ۳ ساعت، هنگامی که رنگ آبی به پایین ژل رسید عملیات الکتروفورز متوقف گردید.

۳-۳-۶- رنگ آمیزی و رنگ‌بری ژل

بعد از اتمام الکتروفورز بعد دوم، ابتدا محلول دستگاه را خالی کرده سپس شیشه‌ها را روی یک دستمال قرار داده و شیشه‌ها به آرامی با لبه‌ی کاردک و با تکان‌های آرام از گوشه‌های شیشه از هم جدا شدند. شیشه رویی کنار گذاشته شد. سپس ژل نگه‌دارنده از ژل جداکننده جدا شد. متعاقباً ژل جداکننده بعد از جدا کردن آرام تمام لبه‌های آن از شیشه، در ظرف پلاستیکی به منظور رنگ آمیزی قرار داده شد. سپس محلول رنگ آمیزی آبی کوماسی (CBB^۱) (۱۲۵۰ cc : متانول، ۲۵۰ cc: استیک اسید و ۷/۵ g: کوماس در حجم نهایی ۲/۵ لیتر با آب دیونیزه) به میزانی که روی ژل را بپوشاند، به ظرف اضافه شد و درب ظرف گذاشته شد. ظرف مذکور به مدت ۲ ساعت روی شیکر قرار داده شد. پس از آن رنگ خالی شد و روی ژل محلول رنگ‌بر^۲ (محتوی ۹۱۶/۶۶۰ cc : متانول و ۲۵۰ cc: استیک اسید در حجم نهایی ۲/۵ لیتر با آب دیونیزه) اضافه شد که کاملاً ژل را در بر بگیرد. رنگ‌بری در مدت ۱۶-۱۲ ساعت در طول شب صورت گرفت. روز بعد محلول رنگ‌بری دور ریخته شد و مجدداً رنگ‌بری مرحله‌ی دوم به مدت ۱۰ دقیقه طول کشید. پس از این مرحله ژل‌ها آماده تصویر برداری گردیدند.

۳-۳-۷- تصویربرداری و تجزیه کمی لکه‌های پروتئینی

به منظور اسکن کردن ژل، سطح صفحه اسکنر چگالی سنج (Bio- Rad GS-800) برای ممانعت از چسبیدن ژل به اسکنر خیس شد و با انتخاب نوع ماده (ژل) و روش رنگ آمیزی (آبی)

1- Commasie Brilliant Blue

2- Destaining Solution

کوماسی) در نرم افزار مربوطه عمل اسکن انجام شد. فایل اسکن شده با پسوند TIFF ذخیره شد تا فراخوانی آن برای تجزیه و تحلیل لکه‌های پروتئینی امکان پذیر باشد. سپس به منظور تجزیه و تحلیل ژل، از فایل اسکن شده استفاده شد و در نرم افزار PDQUEST کلیه تصاویر ژل به همراه تکرارهای آنها فراخوانده شدند و به طور همزمان مورد بررسی قرار گرفتند و لکه‌های مشترک بین تکرارها برچسب‌زده^۱ شد. پس از پایان لکه‌یابی درصد حجمی نقاط برای تکرارهای مختلف بدست آمد و آزمون t برای درصد حجمی هر لکه در سطوح بیماری انجام شد. در آخر لکه‌های پروتئینی که تغییرات معنی‌داری داشتند از بین کلیه لکه‌ها مشخص شدند و روند افزایشی و یا کاهشی بیان آنها در اثر سندروم بر اساس IF^۲ مشخص شدند. نقاطی که دارای IF بالاتر از ۲ بودند لکه‌های پروتئینی با افزایش بیان^۳ و نقاطی که IF کمتر از ۰/۵ داشتند به عنوان لکه‌های پروتئینی با کاهش بیان^۴ معرفی شدند. شاخص IF بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید (Hajheidari et al., 2005).

$$IF = \frac{\text{درصد حجمی لکه‌های پروتئینی در حالت تنش}}{\text{درصد حجمی لکه‌های پروتئینی در حالت شاهد}}$$

با استفاده از اطلاعات بدست آمده در خصوص هر لکه و با مراجعه به پایگاه‌های اطلاعاتی اینترنتی NCBI و ExPASy در خصوص پروتئین‌ها جستجو براساس نقطه ایزوالکتریک (pI) و وزن مولکولی

1- Lable

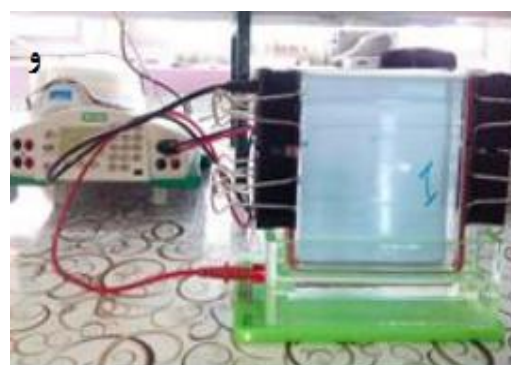
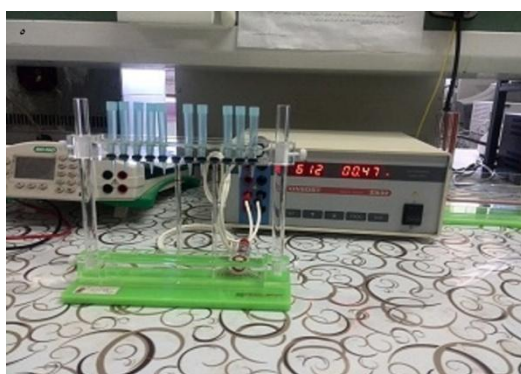
2- Induction Factor

3- Up-regulation

4-Down-regulation

انجام گرفت از طریق مقایسه‌ی این دو شاخص شناسایی پروتئین‌های تفکیک شده به صورت تقریبی

انجام شد (Toorchi et al., 2014).



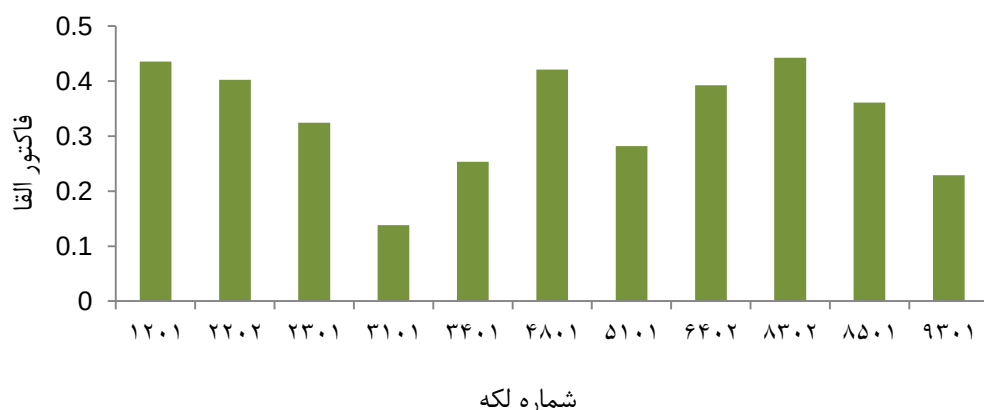
شکل ۳-۳- مراحل مختلف اجرای الکتروفورز ژل دو بعدی

فصل چہارم

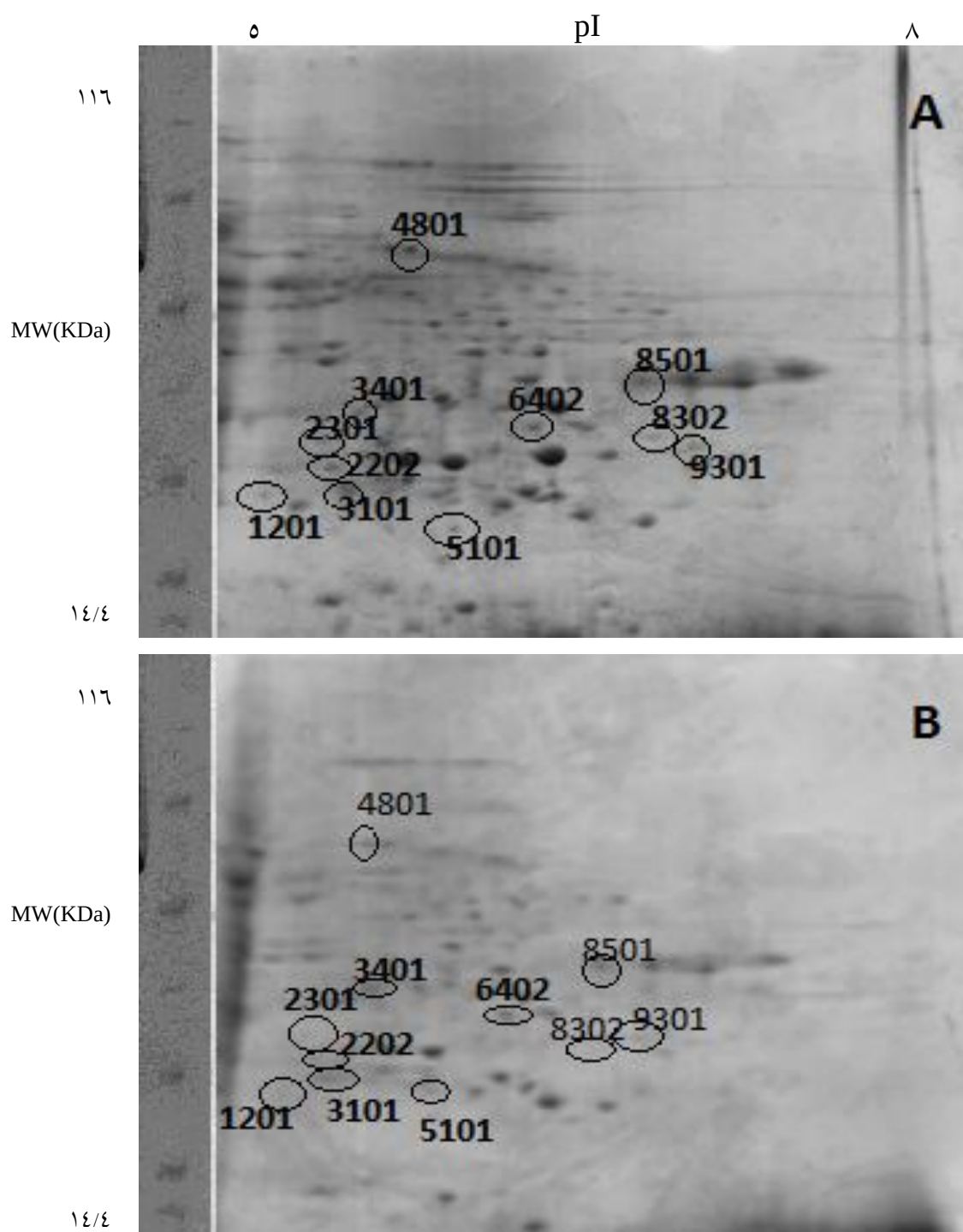
نتائج

۴-۱- تغییر بیان پروتئین‌ها در شرایط ابتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی سویا

برای بررسی الگوی تغییرات پروتئوم در گیاهان سالم و مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی در رقم کتول، پروتئین‌های کل ریشه از گیاهان سالم و مبتلا در مرحله R_6 استخراج شد و با استفاده از الکتروفورز دوبعدی مورد تجزیه و مقایسه قرار گرفت. الکتروفورز دوبعدی با ژل‌های لوله‌ای و رنگ آمیزی به روش آبی کوماسی و تجزیه و تحلیل نقاط پروتئینی با استفاده از نرم افزار PDQuest منجر به شناسایی ۱۲۴ لکه پروتئینی تکرارپذیر شد. کمیت (حجم) لکه‌های مشابه توسط نرم افزار محاسبه شد و آزمون t -استیودنت برای شناسایی لکه‌هایی با کاهش یا افزایش بیان معنی‌دار استفاده گردید. برای افزایش دقت و انتخاب پروتئین‌هایی با تغییرات قابل ملاحظه از نظر بیان، لکه‌های پروتئینی با عامل القای (IF) بزرگتر یا مساوی ۲ با افزایش بیان و لکه‌هایی با IF کوچکتر یا مساوی ۰/۵ نقاطی با کاهش بیان تحت ابتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی سویا در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که از ۱۲۴ لکه تکرارپذیر، ۳۴ لکه بر اساس شاخص IF دارای تغییرات بیان قابل ملاحظه می‌باشد که با انجام آزمون t ، ۱۱ لکه پروتئینی معنی‌دار شناسایی گردید و تمامی لکه‌ها، کاهش بیان نشان دادند (نمودار ۴-۱). نتایج الگوی الکتروفورز دوبعدی در شکل ۴-۱ نشان داده شده است و اطلاعات در مورد لکه‌های پروتئینی دارای تغییرات بیان معنی‌دار در جدول ۴-۱ ارائه شده است.



شکل ۴-۱: تغییرات بیان معنی‌دار پروتئین‌ها در رقم کتول سویای دارای ناهنجاری غلاف‌بند



شکل ۴-۲- لکه‌های پروتئینی شناسایی شده با استفاده از 2DE از ریشه سویا در شرایط ابتلا به ناهنجاری غلاف بندی

(A) و شاهد (B)

جدول ۴-۱: مشخصات پروتئین‌های با بیان متمایز در رقم سویای کنترل مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی سویا در تطبیق با پروتئین‌های پایگاه داده‌ای NCBI و ExPASy

شماره لکه	pI - جرم آزمایشی	pI - جرم تئوری	شماره دسترسی	پروتئین همولوگ
۸۵۰۱	۴۳/۹۳ - ۶/۹۱	۴۴/۵ - ۶/۴۷	Q5F2M9	Glutamate dehydrogenase
۸۳۰۲	۳۰/۷۴ - ۶/۹۶	۳۶/۱۰ - ۶/۸	I1MQN7	uncharacterized protein
۶۴۰۲	۳۲/۵۳ - ۶/۴۸	۲۹/۳ - ۶/۷	p10743	steam 31 KDa glycoprotein
۹۳۰۱	۲۹/۳۵ - ۷/۱۱	۲۹/۳ - ۶/۷	p10743	steam 31 KDa glycoprotein
۳۱۰۱	۲۱/۰۱ - ۵/۷۵	۲۲ - ۶/۰۱	BAA74702	Germing- Like protein
۱۲۰۱	۲۲/۶۹ - ۵/۴۲	۲۲ - ۶/۰۱	BAA74702	Germing- Like protein
۳۴۰۱	۳۵/۲۸ - ۵/۷۹	۳۵/۵ - ۶/۴	O48905	Malate dehydrogenase
۲۳۰۱	۳۰/۲۱ - ۵/۶۵	۲۹/۱ - ۴/۷۵	A0A0B2QJ68	14- 3- 3- Like protein
۴۸۰۱	۸۴/۹۲ - ۶	۸۴/۴ - ۵/۹۳	AAQ08403	Methionine synthase
۵۱۰۱	۱۸/۷۲ - ۶/۱۷	۱۷/۴ - ۶/۱	AF442385	Thioredoxin
۲۲۰۱	۲۶/۲۷ - ۵/۶۸	۲۲ - ۶/۰۱	BAA74702	Germing- Like protein

۲-۴- طبقه‌بندی پروتئین‌های دارای تغییرات بیان بر اساس عملکرد

مشخصات پروتئین‌های مورد شناسایی و دارای تغییرات بیان معنی‌دار، در رقم کتول در جدول

(۱-۴) ذکر شده است. این پروتئین‌ها بر اساس عملکرد بیولوژیکی به پنج گروه دسته‌بندی شدند.

- پروتئین‌های دخیل در متابولیسم و تولید انرژی
- پروتئین‌های دخیل در تقسیط و ذخیره سازی پروتئین
- پروتئین‌های دخیل در انتقال سیگنال
- پروتئین‌های مهار کننده ROS و سم‌زدایی
- پروتئین ناشناخته

۲-۴-۱- پروتئین‌های دخیل در متابولیسم و تولید انرژی

۲-۴-۱-۱- گلوتامات دهیدروژناز

لکه شماره ۸۵۰۱ احتمالا مربوط به آنزیم گلوتامات دهیدروژناز می‌باشد که بیان آن در گیاهان مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی سویا به طور معنی‌دار کاهش یافت (شکل ۳-۴). این آنزیم واکنش تبدیل ۲ اگسوگلو تارات و ال-گلو تارات را کاتالیز می‌کند و به عنوان گیرنده و دهنده نیتروژن ایفای نقش می‌کند. این آنزیم تقریباً در تمام موجودات زنده وجود دارد (Dubois *et al.* 2003) زیرا نقش مهمی در سنتز اوره، متابولیسم واسطه‌ای اسیدهای آمینه و کربوهیدرات‌ها دارد (Liu *et al.* 2008; Forde & Lea 2007).

فونتاین و همکاران (Fontaine *et al.*, 2012) نقش فیزیولوژیکی گلوتامات دهیدروژناز در

گیاهان آراییدوپسیس جهش یافته که فاقد این آنزیم بودند را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که نقش اصلی فیزیولوژیک آن در تامین ۲- اگسوگلو تارات برای چرخه کربس است. بنابراین، احتمال

می‌رود کاهش بیان این آنزیم در گیاهان سویا منجر به کاهش محصول ۲- اگسوجلوتارات برای چرخه کربس خواهد شد (Robinson *et al.*, 1992).

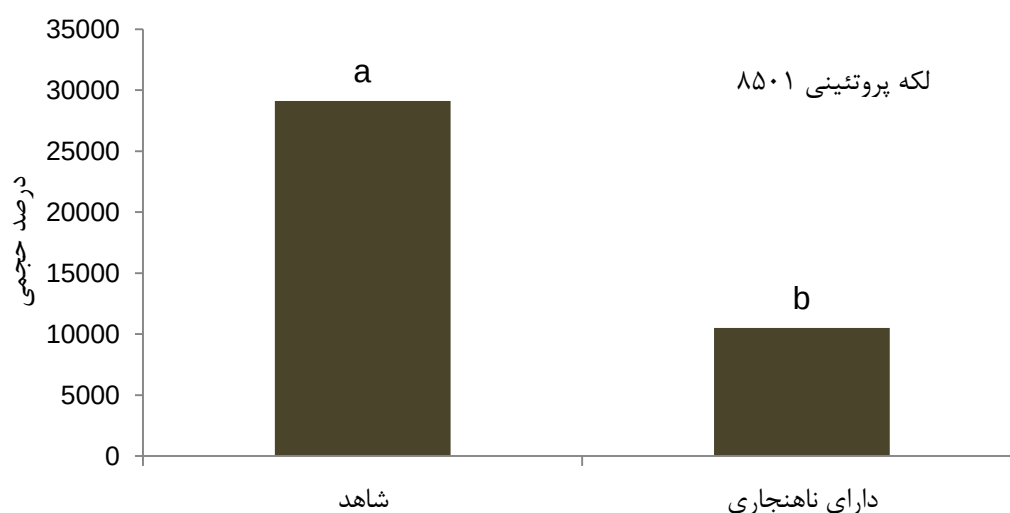
محققین متعددی کاهش بیان گلوتمات دهیدروژناز تحت تنش حرارتی (Hossain *et al.*, 2013) و شرایط غرقابی (Nanjo *et al.*, 2011) در سویا را گزارش کردند. به طور کلی، کاهش بیان این آنزیم منجر به کاهش ترکیبات اسمزی در گیاه می‌گردد و از این طریق منجر به حس تنش می‌گردد (Xu & Zhou, 2006). این آنزیم نقش مهمی در فرآیندهای سیگنال‌دهی داشته و عملکردهای فیزیولوژیکی مهمی در متابولیسم کربن و نیتروژن دارد (Fontaine *et al.*, 2012).

پیغام‌زاده و همکاران کاهش بیان گلوتمات دهیدروژناز را در اندام برگ گیاه سویای مبتلا به ناهنجاری غلاف بندی در رقم گرگان ۳ گزارش کردند و بیان کردند که در مرحله پیری برگ‌ها، تخریب نوکلئوتیدها توسط آنزیم‌های اوره‌آز و سیتیدین دآمیناز و تغییر و تبدیل آمینواسیدهای آزاد شده از تخریب پروتئین‌های سلولی توسط آمینوترانسفراز، منجر به تولید آمونیوم آزاد درون سلولی می‌گردد. بنابراین ضروری است که آمونیوم آزاد که برای سلول‌ها بسیار مضر است بلافاصله به اسید آمینه تبدیل گردد. برای این منظور، آمونیوم ابتدا توسط گلوتمات دهیدروژناز به گلوتمات تبدیل می‌گردد و سپس توسط گلوتامین سنتتاز سیتوسولی به گلوتامین تبدیل می‌شود و به عنوان منبعی برای تولید پرولین و سایر واکنش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. کاهش بیان گلوتمات دهیدروژناز حاکی از کاهش آمین‌زدایی اسید آمینه گلوتامین است. بنابراین مقادیر ۲- اگسوجلوتارات در گیاه مبتلا به عارضه ناهنجاری غلاف بندی کاهش خواهد یافت. مقادیر پایین ۲- اگسوجلوتارات و گلوتامین میزان ¹GS/GOGAT را کاهش می‌دهد و در نتیجه گلوتمات از مسیر ²GABA متابولیزه می‌گردد تا از

1- Glutamin Synthase/Glutamine oxoglutarate aminotransferase

2- Gamma-Aminobutyric acid

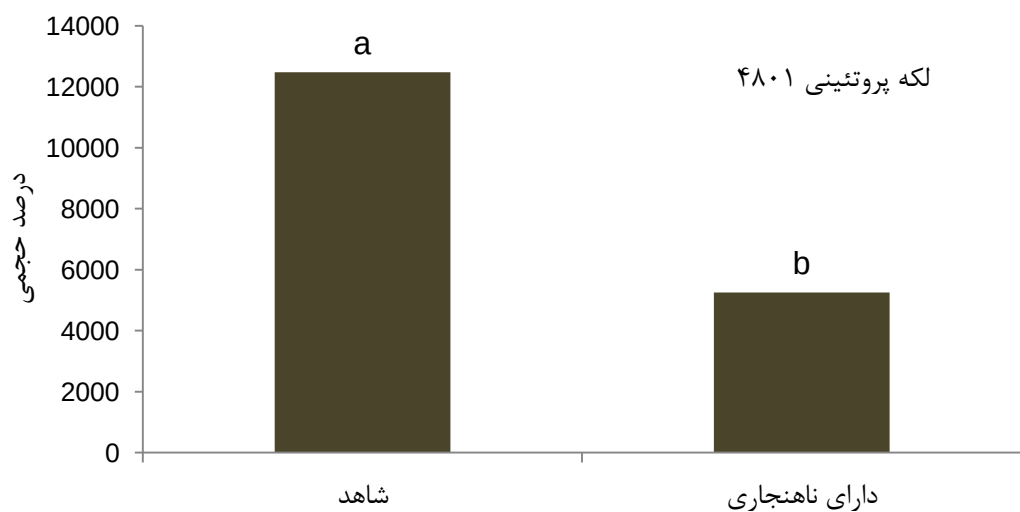
تجمع آن جلوگیری شود. سپس گروه آمین GABA به پیرووات انتقال می‌یابد تا آلانین تولید شود و در ادامه در صورت دسترسی کافی به اگزوالواستات، آلانین ترانس آمینه می‌گردد و به آسپارات تبدیل می‌شود. در نتیجه به دلیل عدم دسترسی کافی به اگزوالواستات، جریان چرخه کربن کاهش می‌یابد و این موضوع نشان دهنده عملکرد غیر طبیعی این چرخه در رقم گرگان ۳ است (Payghamzadeh *et al.*, 2017).



شکل ۴-۳- میزان بیان لکه پروتئینی ۸۵۰۱ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف بندی

۴-۲-۱-۲- متیونین سنتتاز

لکه پروتئینی شماره ۴۸۰۱ احتمال دارد مربوط به متیونین سنتتاز باشد که بیان آن در گیاهان مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی سویا به طور معنی‌دار کاهش یافت (شکل ۴-۴). این پروتئین در سوخت و ساز اسید آمینه‌ها نقش دارد و برای رشد و نگهداری گیاه ضروری است. پاتوژن‌ها معمولاً فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف را تحت تاثیر قرار می‌دهند که مهمترین آن‌ها فرآیند متابولیسم می‌باشد (Zhang *et al.*, 2011). بنابراین کاهش پروتئین متیونین سنتتاز در گیاهان مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی نشان‌دهنده ایجاد اختلال در متابولیسم این گیاهان می‌باشد. در گیاه گندم کاهش این پروتئین در پاسخ به تنش غرقابی گزارش شده است (Huang *et al.*, 2006).



شکل ۴-۴- میزان بیان لکه پروتئینی ۴۸۰۱ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف‌بندی

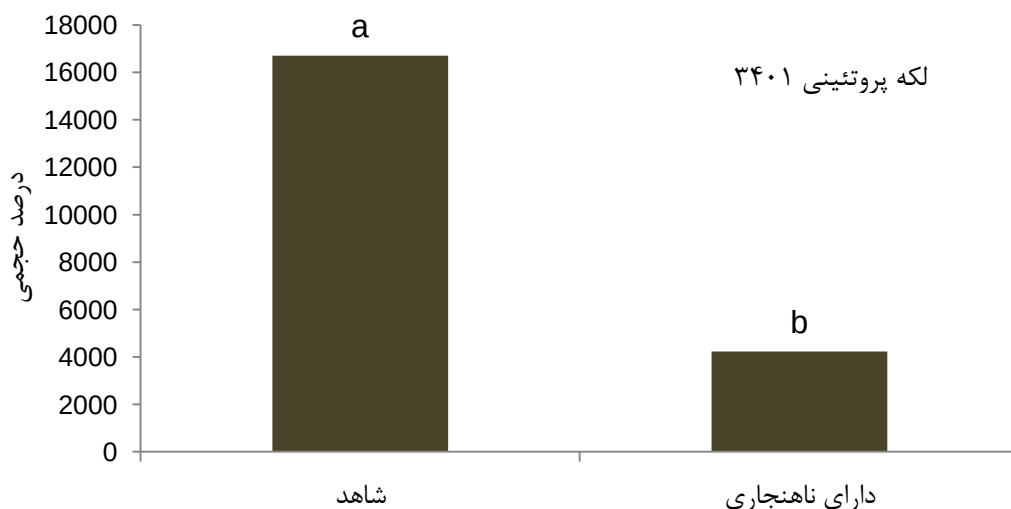
۴-۲-۱-۳- مالات دهیدروژناز

لکه شماره ۳۴۰۱ احتمالاً مربوط به آنزیم مالات دهیدروژناز باشد که بیان آن در گیاهان مبتلا به ناهنجاری غلافبندی سویا به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۴-۵). این آنزیم یکی از آنزیم‌های چرخه کربس می‌باشد و مالات یکی از فراورده‌های گلیکولیز است. در گلیکولیز، آگزوالوستات توسط مالات دهیدروژناز به مالات احیا می‌شود که در این فرآیند از NADH به عنوان منبع الکترون استفاده می‌شود و به NAD^+ تبدیل می‌گردد. مالات حاصل می‌تواند در واکوئل ذخیره شود و یا در میتوکندری به منظور تولید ATP متابولیزه شود و یا وارد چرخه کربس در میتوکندری شود و به وسیله مالات دهیدروژناز به آگزوالواستات تبدیل شود (Wang *et al.*, 2012) که در این واکنش NADH تولید می‌گردد که برای احیای نیتрат مورد استفاده قرار می‌گیرد (Scheibe, 2004). کاهش بیان مالات دهیدروژناز حاکی از کاهش تبدیل مالات به آگزوالواستات و بالعکس است. بنابراین، مقادیر ۲- آگسولوتارات در گیاه مبتلا به ناهنجاری غلافبندی سویا کاهش خواهد یافت. مقادیر پایین ۲- آگسولوتارات و مالات میزان جریان چرخه کربس را محدود خواهد کرد و در نتیجه، به دلیل عدم دسترسی کافی به آگزوالواستات، جریان چرخه کربن کاهش می‌یابد و این موضوع نشان دهنده عملکرد غیر طبیعی این چرخه در رقم کتول است.

ین و همکاران (Yin *et al.*, 2009) تاثیر دامنه‌های حرارتی مختلف (۴، ۱۰ و ۲۲ درجه- سانتی‌گراد) را بر رشد سویا را با رهیافت پروتئومیک مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که تحت تیمار سرمایی پروتئین‌های درگیر در متابولیت‌های میتوکندریایی از جمله مالات دهیدروژناز کاهش بیان داشتند.

پیغام‌زاده و همکاران کاهش بیان مالات دهیدروژناز را در اندام برگ گیاه سویای مبتلا به ناهنجاری غلاف بندی در رقم گرگان ۳ گزارش کردند و بیان کردند که کاهش سطح مالات دهیدروژناز سیتوسولی در رقم گرگان ۳ نشان می‌دهد که در شرایط ابتلا به عارضه ناهنجاری غلاف

بندی سویا مسیر تولید پیروات فعال تر است و تولید ملات از طریق احیای اگزالوستات کاهش می‌یابد. این چرخش مسیر می‌تواند به دلیل تولید ATP در مسیر تبدیل فسفو انول پیروات به پیروات باشد که انرژی لازم برای فعالیت‌های متابولیکی را تامین کند. احتمالاً، این تغییر مسیر متابولیکی ممکن است یکی از راهکارهای مهم برای تولید ATP برای فعالیت آنزیم رابیسکو اکتیواز باشد که به نوبه خود منجر به تنظیم فعالیت آنزیم رابیسکو می‌گردد. فعالیت رابیسکو توسط نسبت ATP/ADP کلروپلاستی تنظیم می‌شود و با افزایش این نسبت این آنزیم فعال تر خواهد شد. در شرایط محدودیت انرژی، مسدود کردن مسیرهای دور و استفاده از مسیرهایی که امکان ذخیره انرژی وجود دارد در سازگاری سویا به این عارضه می‌تواند موثر باشد. کاهش بیان ملات دهیدروژناز حاکی از کاهش تبدیل ملات به اگزالواستات و بالعکس است. بنابراین، مقادیر ۲- اگسوجلوتارات در گیاه مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی سویا کاهش خواهد یافت و در نتیجه، به دلیل عدم دسترسی کافی به اگزالواستات، جریان چرخه کربن کاهش می‌یابد و این موضوع نشان دهنده عملکرد غیر طبیعی این چرخه در رقم گرگان ۳ است (Payghamzadeh *et al.*, 2017).



شکل ۴-۵- میزان بیان لکه پروتئینی ۳۴۰۱ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف بندی

۴-۲-۲- پروتئین‌های دخیل در تقسیط و ذخیره سازی پروتئینی

۴-۲-۲-۱- گلیکوپروتئین ۳۱ کیلو دالتونی ساقه‌ای

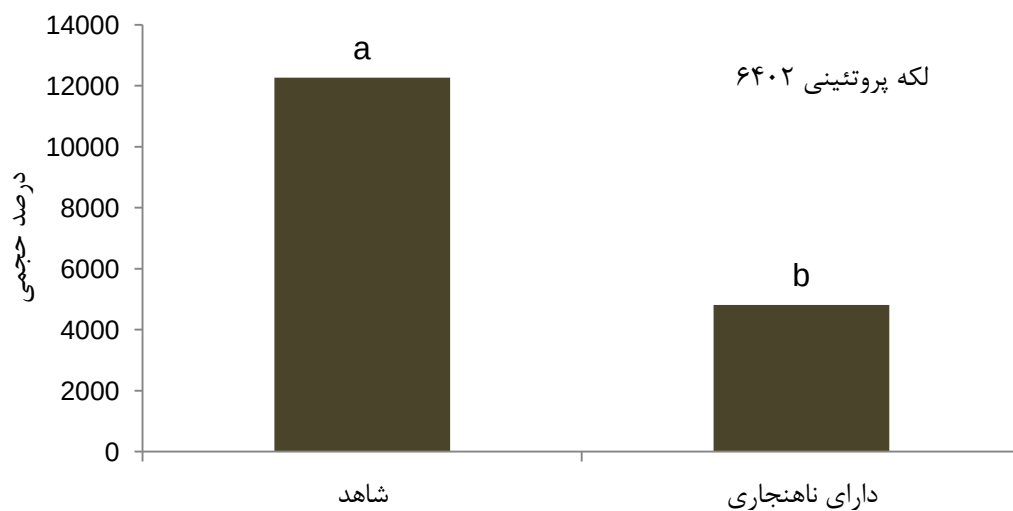
پروتئین‌های دخیل در تقسیط و ذخیره سازی پروتئینی لکه‌های شماره ۶۴۰۲ و ۹۳۰۱ می‌باشند که ممکن است این لکه‌ها مربوط به گلیکوپروتئین ۳۱ کیلو دالتونی ساقه‌ای باشد که بیان آن در گیاهان مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی سویا به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۴-۶ و ۴-۷). پروتئین‌های ذخیره‌ای رویشی یا گلیکوپروتئین‌ها که گلیکوپروتئین ۳۱ کیلو دالتونی ساقه‌ای یکی از این پروتئین‌ها است، اولین بار به عنوان پروتئین‌های ذخیره‌ای برگ در گیاهان سویای غلاف‌زدایی شده مشاهده شد و دارای دو زیر واحد آلفا و بتا می‌باشد (Wittenbach, 1983b; Mason *et al.*, 1988). بر اساس الگوی تجمع پروتئین‌های ذخیره‌ای، مکان تجمع این پروتئین‌ها واکوئل سلول‌های غلاف آوندی بوده و تجمع آن‌ها در پاسخ به حذف اندام‌های زایشی ناشی از بلوکه شدن انتقال آن‌ها از طریق آوندهای برگ می‌باشد. پیشنهاد شده است که این پروتئین‌ها نه تنها به عنوان مخزن ذخیره-سازی موقت کربن و نیتروژن ایفای نقش می‌کنند بلکه نقش مهمی در تغذیه و سازگاری به تنش‌ها در مدت رشد و توسعه گیاه دارند (Sözen, 2004). این پروتئین می‌تواند در ترمیم غشاء آسیب‌دیده در اثر تنش‌های مختلف نقش داشته باشد و در نتیجه این گونه از ارقام سویا نمی‌توانند به طور مناسب پاسخ مناسبی در برابر تنش‌های مختلف نشان دهند (Aghaei *et al.*, 2009).

افروز و همکاران (Afroz *et al.*, 2010)، وجود این نوع گلیکوپروتئین در اندام‌های ریشه، هیپوکوتیل و برگ گیاهچه‌های ۷ روزه سویا را گزارش کردند و بیان کردند که وجود و تجمع این پروتئین‌های ذخیره‌ای، نشان دهنده مصرف این پروتئین‌ها به عنوان منبع غذایی و تولید انرژی برای رشد و نمو است.

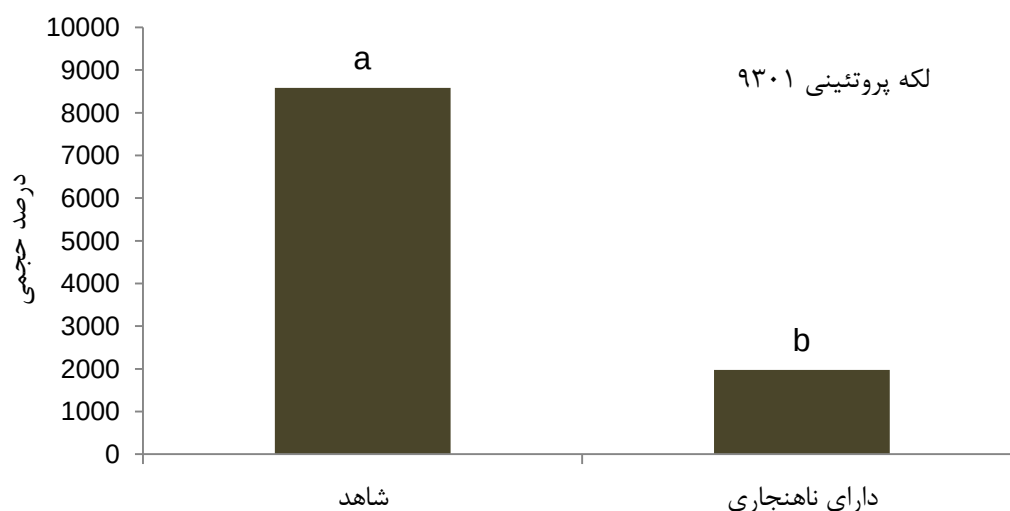
کاهش بیان گلیکوپروتئین ۳۱ کیلو دالتونی ساقه‌ای در بافت‌های مختلف در اثر تنش شوری

(Yin *et al.*, 2014) و تنش غرقاب (Komatsu *et al.*, 2010) توسط محققین گزارش شده است.

پیغامزاده و همکاران کاهش بیان گلیکوپروتئین ۳۱ کیلو دالتونی ساقه‌ای را در اندام برگ گیاه سویای مبتلا به ناهنجاری غلاف بندی در رقم گرگان ۳ گزارش کردند و بیان کردند که در گیاهان سویای مبتلا به ناهنجاری به علت عدم وجود غلاف و یا غلاف‌های بسیار کم و عقیم، به نظر می‌رسد که انتقال مجدد در این گیاهان فعال نیست و یا بسیار کم است و در نتیجه ممکن است گلیکوپروتئین‌های ذخیره‌ای اندام‌ها تجزیه و منتقل نشده و احتمالا عدم نیاز به این پروتئین‌ها منجر به کاهش بیان ژن و در نتیجه بیان پروتئین در این گیاهان گردد (Payghamzadeh *et al.*, 2017).



شکل ۴-۶- میزان بیان لکه پروتئینی ۶۴۰۲ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف بندی



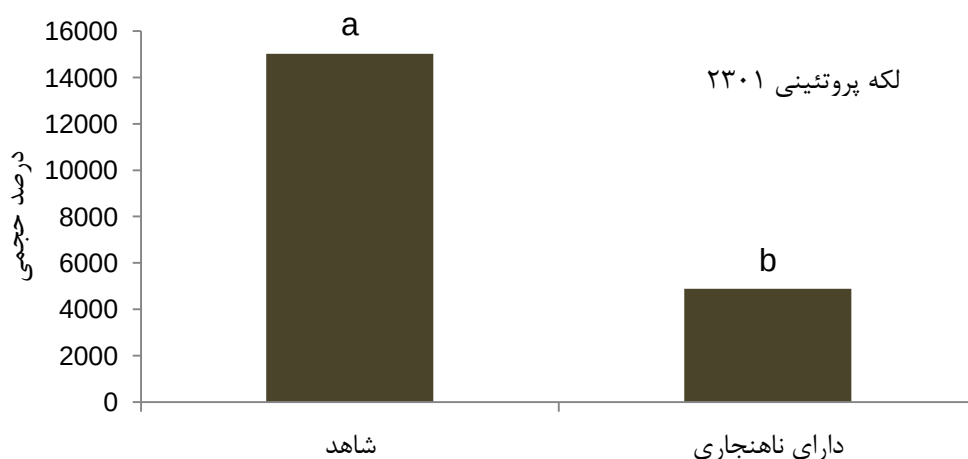
شکل ۴-۷- میزان بیان لکه پروتئینی ۹۳۰۱ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف بندی

۴-۲-۳- پروتئین دخیل در انتقال سیگنال

پروتئین دخیل در انتقال سیگنال مربوط به لکه شماره ۲۳۰۱ می باشد که این لکه پروتئینی احتمالا مربوط به 14-3-3-Like protein می باشد که بیان آن در گیاهان مبتلا به ناهنجاری غلاف-بندی سویا به طور معنی داری کاهش یافت (شکل ۴-۸). این پروتئین در واکنش های فیزیولوژیکی و تنظیمی متعددی ایفای نقش می کند و همچنین در پر شدن دانه نقش دارد (Hajduch *et al.*, 2005). این پروتئین ها نقش تنظیمی مهمی در فعالیت H-ATPase غشاء پلاسمایی دارند (Shanko *et al.*, 2003). به طوری که این آنزیم در ایجاد شیب غلظت پروتئین در سرتاسر غشاء نقش مهمی دارد تا به این وسیله انرژی مورد نیاز برای انتقال ثانویه، تنظیم تورژسانس سلولی و pH درون سلولی را تامین کند (Martínez – Zaguilán & Sennoune 2016). در مطالعه نوری و کوماتسو (Nouri & Komatsu, 2010) دو و یک لکه پروتئینی 14-3-3-Like protein تحت تنش اسمزی ایجاد شده به وسیله پلی اتیلن گلیکول تا ۱۰ درصد کاهش بیان داشته است. در گیاه ذرت نیز کاهش بیان 14-3-3-Like protein در گیاهان تحت تنش شوری گزارش شده است (Zörb *et al.*, 2010).

از آنجایی که این پروتئین نقش تنظیمی مهمی دارد و وجود آن‌ها در مدت پر شدن دانه ضروری می‌باشد (Hajduch *et al.*, 2005)، احتمال دارد کاهش بیان این پروتئین به طرز ناشناخته‌ای منجر به عدم توسعه دانه در گیاهان مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی سویا گردد. به طور کلی در این مطالعه، تغییر بیان 3-3-3-Like protein ممکن است به طرق مختلف و ناشناخته فعالیت ATPase غشاء پلاسمایی، محرک‌های سیگنال‌دهی، رشد سلول و غیره را تحت تاثیر قرار دهد و از این طریق منجر به ایجاد عارضه ناهنجاری غلاف‌بندی سویا گردد..

پیغام‌زاده و همکاران کاهش بیان 3-3-3-Like protein را در اندام برگ گیاه سویای مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی در رقم گرگان ۳ گزارش کردند و بیان کردند که پروتئین 3-3-3-Like protein خانواده‌ای از مولکول‌های تنظیم کننده محافظت شده هستند که در سلول‌های همه یوکاریوت‌ها بیان می‌شوند. این پروتئین‌ها به طیف گسترده‌ای از پروتئین‌های مرتبط با سیگنال‌دهی آبشاری از جمله کینازها، فسفاتازها و گیرنده‌های تراغشایی متصل می‌شوند. طیف عمل این پروتئین با بسیاری از پروتئین‌های دیگر نشان از نقش مهم آن‌ها در طیف گسترده‌ای از فرایندهای تنظیمی حیاتی می‌باشد بنابراین ممکن است این پروتئین از جمله تنظیم کننده‌های کلیدی عارضه ناهنجاری غلاف‌بندی سویا باشد (Payghamzadeh *et al.*, 2017).

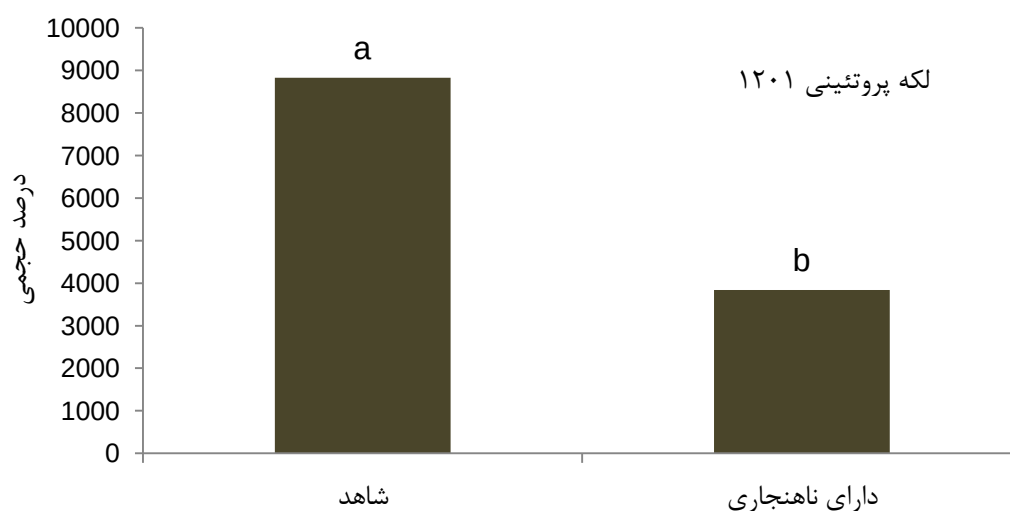


شکل ۴-۸- میزان بیان لکه پروتئینی ۲۳۰۱ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف‌بندی

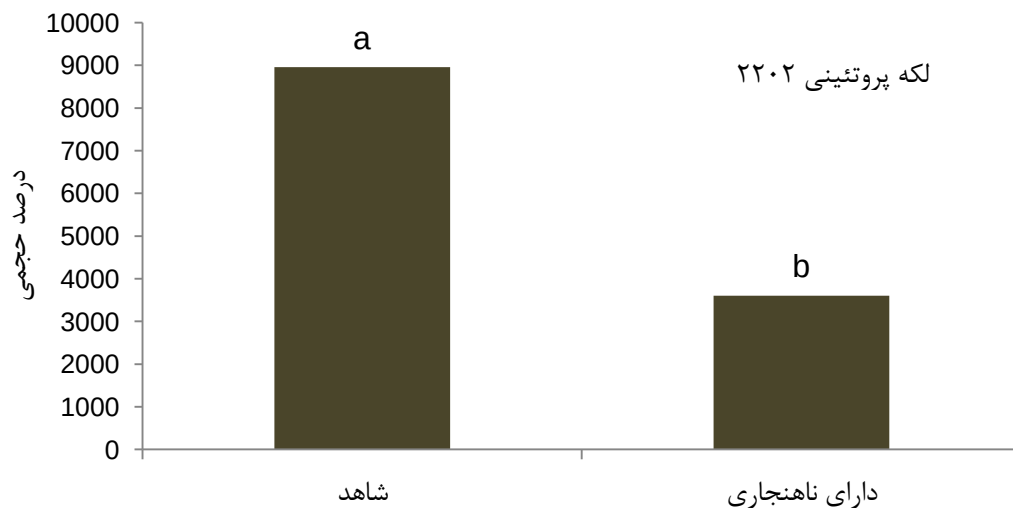
۴-۲-۴- پروتئین‌های مهار کننده ROS و سم‌زدایی

۱-۴-۲-۴- Germin- Like پروتئین

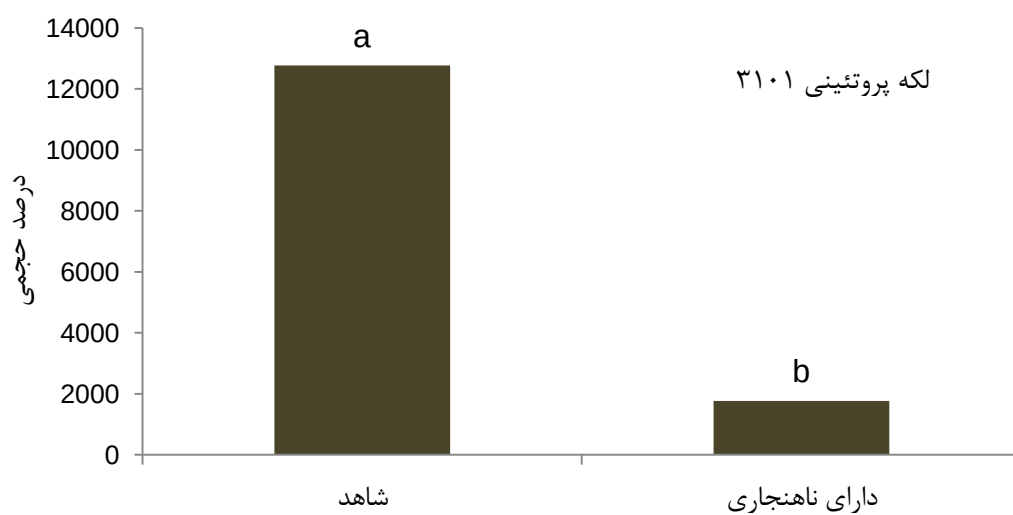
لکه‌های شماره ۱۲۰۱، ۲۲۰۲ و ۳۱۰۱ احتمالاً مربوط به پروتئین Germin- Like باشد که بیان آن در گیاهان مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی سویا به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۹-۴، ۱۰-۴ و ۱۱-۴) که از پروتئین‌های مهار کننده ROS و سم‌زدایی می‌باشند. این پروتئین در طی جوانه‌زنی دانه در گیاهچه‌های جوان گندم و همچنین در برگ‌های بالغ در واکنش به حمله پاتوژن بیان می‌شوند. پروتئین‌های شبه جرمین به عنوان پروتئین‌های مرتبط با دیواره سلولی توصیف شده‌اند. برخی از اعضای خانواده شبه جرمین فعالیتی شبیه اگسالات اکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز نشان می‌دهند (Gucciardo *et al.*, 2007). تولید H_2O_2 در نتیجه فعالیت سوپراکسید دیسموتازی حاکی از نقش این پروتئین‌ها در استحکام دیواره سلولی و مقاومت در برابر حمله پاتوژن‌ها و تنش‌های غیر زیستی است (Lane, 1994).



شکل ۹-۴- میزان بیان لکه پروتئینی ۱۲۰۱ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف بندی



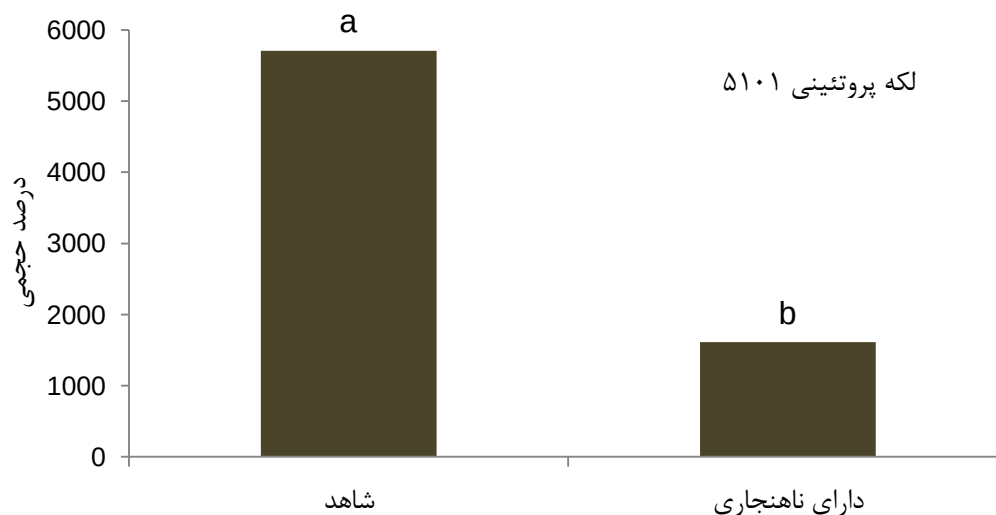
شکل ۴-۱۰- میزان بیان لکه پروتئینی ۲۲۰۱ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف بندی



شکل ۴-۱۱- میزان بیان لکه پروتئینی ۳۱۰۱ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف بندی

۲-۴-۲-۴- پروتئین تیرودکسین

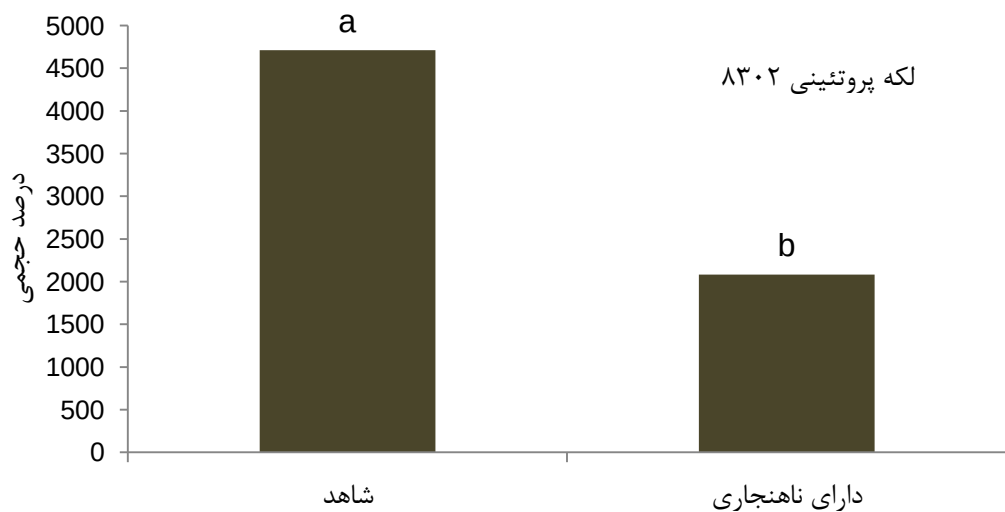
لکه شماره ۵۱۰۱ احتمالا مربوط به پروتئین Thioredoxin می‌باشد که بیان آن در گیاهان مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی سویا به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۴-۱۲). Thioredoxin، آنزیم آنتی اکسیدان می‌باشد که در بهبود فرآیندهای سلولی نقش دارد و در گیاهان حائز اهمیت می‌باشد. در فرآیندهای متعدد از جمله متابولیسم چربی، حمل و نقل غشاء، متابولیسم هورمون‌ها و سنتز ATP نقش دارد (Jean- Francois & Joris Messens 2010). این آنزیم یک آنتی اکسیدان مهم برای از بین بردن ROS می‌باشد. در گیاهان سویای تحت تنش اسمزی، افزایش بیان این پروتئین با تحمل بالای گیاه نسبت به تنش همراه بود. (Toorchi *et al.*, 2009).



شکل ۴-۱۲- میزان بیان لکه پروتئینی ۵۱۰۱ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف بندی

۴-۲-۵- پروتئین ناشناخته

پروتئین ناشناخته مربوط به لکه شماره ۸۳۰۲ می‌باشد که تحت شرایط ابتلا به عارضه ناهنجاری غلاف بندی کاهش بیان داشت (شکل ۴-۱۳). پیغامزاده و همکاران کاهش بیان این پروتئین را در بافت برگ رقم گرگان ۳ سویای مبتلا به ناهنجاری غلاف بندی گزارش کردند و در تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی تحت عنوان پروتئین Methylecgonone reductase شناسایی شد (Payghamzadeh *et al.*, 2017).



شکل ۴-۱۳- میزان بیان لکه پروتئینی ۸۳۰۲ در شرایط سالم و دارای ناهنجاری غلاف بندی

نتیجه گیری کلی

تجزیه و تحلیل پروتئوم ریشه سویا رقم کنترل منجر به شناسایی ۱۲۴ لکه پروتئینی تکرارپذیر شد. از بین این پروتئین‌ها ۱۱ لکه به طور معنی‌دار تغییر بیان داشتند. این پروتئین‌ها بر اساس عملکرد بیولوژیک، در پنج گروه طبقه بندی شدند.

پروتئین‌های مرتبط با تولید انرژی مربوط به گلوتامات دهیدروژناز، متیونین سنتتاز و ملات دهیدروژناز می‌باشد.

پروتئین مرتبط با تقسیط و ذخیره‌سازی، گلیکوپروتئین ۳۱ کیلو دالتونی ساقه‌ای می‌باشد.

پروتئین مرتبط با انتقال سیگنال مربوط به 3-3-3-Like protein می‌باشد.

پروتئین‌های مرتبط با مهار ROS و سم زدایی شامل پروتئین Germin- Like و تیرودوکسین می‌باشد.

پروتئین ناشناخته در تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی تحت عنوان پروتئین Methylecgonone reductase شناسایی شد.

تمامی این پروتئین‌ها در بافت ریشه سویای مبتلا به ناهنجاری غلاف بندی کاهش بیان را نشان دادند. به طور کلی در این مطالعه احتمال می‌رود که پروتئین‌های گلوتامات دهیدروژناز و ملات دهیدروژناز که مربوط به پروتئین‌های دخیل در تولید انرژی می‌باشند، به دلیل کاهش بیان موجب کاهش مقدار ۲-اگسوگلو تارات شده و با بروز اختلال در چرخه کربن در ایجاد عارضه ناهنجاری غلاف بندی سویا نقش داشته باشند و همچنین، تغییر بیان 3-3-3-Like protein ممکن است به طرق مختلف و ناشناخته فعالیت ATPase غشاء پلاسمایی، محرک‌های سیگنال‌دهی، رشد سلول و غیره را تحت تاثیر قرار دهد و از این طریق منجر به ایجاد عارضه ناهنجاری غلاف بندی سویا گردد..

پیشنهادات

- ۱- پیشنهاد می‌شود تجزیه پروتئوم سایر ارقام سویا نیز به منظور تایید و تکمیل مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گیرد.
- ۲- جهت شناسایی پروتئین‌ها از روش‌های دقیق تعیین پروتئین‌ها مثل لکه‌گذاری، توالی‌یابی ادمن و طیف‌سنجی جرمی استفاده شود.
- ۳- پس از تایید پروتئین‌های دارای تغییرات بیان معنی‌دار در سایر ارقام از روش‌های مهندسی پروتئین برای حل ناهنجاری غلاف بندی سویا استفاده گردد.

منابع

احمدی، م. (۱۳۷۸)، کیفیت و کاربرد دانه‌های روغنی، ناگار، اج، اس، (مولف)، چاپ اول، انتشارات نشرآموزش کشاورزی، ص ۱۱۳.

برزعلی، م.، جوانشیر شکیبا، ع.، و نوری‌نیا، ر. (۱۳۸۲). اثر روش‌های مختلف خاک‌ورزی بر عملکرد سویا در منطقه گرگان. مجله نهال و بذر. ۱۹: ص ۱۸۹-۱۷۳.

چراغعلی، ع. (۱۳۶۷)، نتایج بررسی‌های طرح علل پیدایش اختلال در غلاف بندی سویا- منطقه گرگان و گنبد، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و گنبد، ص ۵۳.

خواجه‌پور، م.، ر. (۱۳۸۳)، گیاهان صنعتی، چاپ دوم، انتشارات جهاد دانشگاهی اصفهان، ص ۵۶۴.
رحیمیان، ح.، ا. حمداله زاده و م. منتظری، (۱۳۷۴)، شناسایی عوامل ویروسی همراه با بیماری اختلال درغلاف‌بندی سویا، خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، آموزشکده کشاورزی کرج، صفحه ۱۰۹.

زینعلی خوانقواه، ح.، و سوهانی، ا. (۱۳۸۰)، بررسی ژنتیکی بعضی از صفات مهم گیاهان زراعی با عملکرد دانه درسویا از طریق روش‌های آماری چند متغیره، مجله علوم زراعی ایران، شماره ۳۰: ص ۸۱۶-۸۰۷.

عضدی، م.، ص.، دلیلان، (۱۳۹۰)، کاربرد پروتئومیکس در بیماری‌ها، <http://www.pezeshkyemrooz>.

علوی، ج. (۱۳۸۱)، گزارش طرح نهایی شناسایی بال ریشکداران (Thysanoptera)، بررسی پراکنش و تعیین گونه غالب در مزارع استان گلستان در ارتباط با اختلال در غلاف‌بندی سویا، مرکز تحقیقات کشاورزی استان گلستان.

فرجی، ا.، رئیسی، س.، و هزار جریبی، ا. (۱۳۹۱)، گیاهان روغنی (ترجمه)، نشر نوروزی، ص ۵۴۲.

کریمی، م.، و رنجبر، غ.، (۱۳۶۷)، مقایسه عملکرد و اجزای عملکرد ارقام سویا در تاریخ کاشت‌های

متفاوت در اصفهان، مجله علوم کشاورزی ایران، ۳۴: ص ۱۹-۲۳.

کریمی، هادی، (۱۳۶۸)، گیاهان زراعی، انتشارات دانشگاه تهران، ۳۸۷ ص.

لطیفی، ناصر، (۱۳۷۵)، سویا. زراعت- فیزیولوژی-مصارف، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ص ۲۸۲.

ناصری، ف.، (۱۳۷۰)، در ترجمه دانه‌های روغنی، وایس، ای، ا.، (مؤلف)، چاپ دوم، انتشارات آستان

قدس رضوی، ص ۸۲۳.

هزار جریبی، ا.، (۱۳۸۷)، بررسی همبستگی ژنتیکی درصد روغن دانه و برخی از صفات مهم زراعی از

طریق تجزیه علیت، مجله علوم کشاورزی ایران ۸۶، ص ۷۸-۱۰۲.

Afroz, A. et al., (2010). Analyses of the proteomes of the leaf, hypocotyl, and root of young Soybean seedlings. **Protein Pept.. Lett.**, 17(1875-5305 (Electronic)), pp.319-331. Available at: <file:///d:/PhD Thesis/The All PhD References/Analyses of the proteomes the leaf, hypocotyls, and root of young soybean seedlings.htm>
<http://www.eurekaselect.com/85706/article>.

Aghaei, K. et al., (2009). Proteome analysis of soybean hypocotyls and root under salt stress. **Amino Acids**, 36(1438-2199(Electronic)), pp.91-98. Available at: <file:///d:/PhD Thesis/The All PhD References/Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress.htm>.

Alam, I. et al., (2010). Proteome analysis of soybean roots subjected to short-term drought stress. **Plant Soil**, 333(1-2), pp.491-505. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-010-0365-7>.

Alexandratos, N. & Bruinsma, J., (2012). World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision.

Bradford MM., (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytica Biochemistry Quantities** 72(1-2): 248-254.

Boethel, D. J. et al., (2000). Delayed maturity associated with southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) injury at various soybean phenological stages. **J.**

- Econ. Entomol.**, 93(3), pp.707-712. Available at: <http://www.entsoc.org/PDF/Pubs/Periodicals/JEE/JEETOCS/PDF/ec030000707p.pdf>.
- Chen, W. et al., (2002). Experissson profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggest their putative function in response to environmental stresses. **Plant Cell**, 14, pp.559-547. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC150579/pdf/PC14030559.pdf>.
- Dawley, K., (2010). GMO Insanity – Mad soy disease strikes brazil. Available at: [file:///D:/PhD Thesis/The All PhD References/GMO Insanity - Mad Soy Disease Strikes Brazil.htm](file:///D:/PhD%20Thesis/The%20All%20PhD%20References/GMO%20Insanity%20-%20Mad%20Soy%20Disease%20Strikes%20Brazil.htm) [Accessed December 29,2015].
- Dhaliwal, G. S., Jindal, V. & Dhawan, A. K., (2010). Insect pest problems and crop losses: changing trends. **Indian J Ecol**, 37(1), pp.1-7. Available at: <http://xa.yimg.com/kq/groups/14164994/1101957593/name/Dr+Dhaliwal+article.PDF>.
- Ding, D. et al., (2002). Development of a cytoplasmic-nuclear male-sterile line of soybean. **Euphytica**, 124, pp.85-91. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1015683526982#page-1>.
- Dubois, F. et al., (2003). Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? **Plant Physiology and Biochemistry**, 41(6), pp.565-576.
- Egli, D. B. & Caviness, C. E., (1980). Depodding causes green-stem syndrome in soybean, **Crop Management**, Online, Crop Manegement, DOI:10.1094/CM-2006-0104-01-RS.
- FAOSTAT. (2016). FAO statistical database. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Available at: <http://faostat.fao.org/faostat/collections?sucset=agriculture>.
- Fehr, W. R. & Caviness, C. E., (1980). **Stages of soybean development**. Agriculturnd Homeconomics Experimental Station and Cooperative Extention Service, owa State University and Arkansas Agricultural Experimental Stationarypeculation. Reperint 80.
- Fontaine, J. X. ET AL., (2012). Characterization of a NADH-dependent glutamate dehydrogenase mutant of Arabidopsis demonstrates the key role of this enzyme in root carbon and nitrogen metabolism. **The Plant Cell**, 24(10), pp.4044-4065.

- Forde, B. G. & Lea, P. J., (2007). Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signaling. **Journal of Experimental Botany**, 58(9), pp.2339-2358.
- Giesler, L. J. et al., (2002). Bean pod mottle virus: A Threat to U. S. soybean production. **Plant Pathology**, 186(12), pp.1280-1289. Available at: <http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1186&context=plantpathpapers> [Accessed December 29, 2015].
- Grau, C. R., (2013). Current information on green stem in soybean. Available at: <http://www.soils.wisc.edu/extension/wcmc/2003proceedings/Grau-1.pdf>.
- Grau, C. R., (2013). Current information on green stem in soybean. Available at: <http://www.soils.wisc.edu/extension/wcmc/2003proceedings/Grau-1.pdf>.
- Gucciardo, S., Wisniewski, J., Brewin, N. and Bornemann, S. (2007). A germin-like protein with superoxide dismutase activity in pea nodules with high protein sequence identity to a putative rhicadhesin receptor. **Journal of Experimental Botany**, 58:1161-1171.
- Hajheidari, M., Abdollahian-Noghabi, M., Askari, H., Heidari, M., et al., (2005). Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. **Proteomics**, 5:950-960.
- Hajduch, M. et al., (2005). A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. **Plant Physiology**, 137(4), pp.1397-1419. Available at: [file:///d:/PhD Thesis/The All PhD References/A Systematic Pr Proteomic Study of Seed Filling in Soybean.pdf](file:///d:/PhD%20Thesis/The%20All%20PhD%20References/A%20Systematic%20Proteomic%20Study%20of%20Seed%20Filling%20in%20Soybean.pdf).
- Huang B., Chu C. H., Chen S. H., Juan H. F., Chen Y. M. (2006). A proteomics study of the mung bean glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase regulated by brassinosteroids under conditions of chilling stress. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 11, 264–278. 10.2478/s11658-006-0021-7
- Hao, X.-Y. et al., (2010). Impact of climatic change on soybean production; A review. **Chinese Journal of Applied Ecology**, 21(10), pp.2697-2706. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77958180028&partnerID=40&md5=72bd17aac091c7f56490306acd57dfb4>.

- Hobbs, H.A. et al., (1980). Green stem disorder of soybean. **Plant Dis.**, 90(4), pp.513–518. Available at: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/101094/PD-90-0513> [Accessed December 29, 2015].
- Holshouser, D., (2009). Green stem syndrome in soybean. Available at: <https://pubs.ext.vt.edu/2912/2912-1430/2912-1430.htm1> [Accessed January 8, 2016].
- Hossain, Z., Khatoon, A. & Komatsu, S., (2013). Soybean proteomics for unraveling abiotic stress response mechanism. **J. Proteome Res.**, 12(11), pp.4670-4684.
- Huch, C. J. (2004). Integrated transcriptome and proteome data; The challenges ahead. **Brief Functional Genomics and Proteomics**, 3:212-219.
- Hymowitz, T. & Singh, R. J., (1987). **Taxonomy and speciation in soybean: improvement, production, and uses.**
- Jadhav, P. V. et al., (2013). Symptomology and Seriodiagnosis of soybean floral distortion occurring in central Indiana. **Egyptian Journal of Biology**, 15, pp.59-65. Available at: <http://www.nottingham.ac.uk/~plzfg/EBBSoc/ejb15/9-Jhadav et al 2013.pdf>.
- Jaleel, C. A. et al., (2009). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. **Int. J. Agric. Biol**, 11(1), pp.100-105.
- Jean-Francois collet and Joris Messens, (2010). <http://www.researchgate.net/publication/41411135>.
- Komatso, S., Han, C., Nanjo, Y., Nahar, M, A., Wang, K., He, D and Yang, P, (2013), Label-Free Quantitative Proteomic Analysis of Absciscic Acid Effect in Early-Stage Soybean under Flooding, **J, Proteome, Res**, DOI:10.1021/pr4001898.
- Komatso, S. et al., (2010). Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in soybean cell wall during flooding stress. **Amino acids**, 39(5), pp.1435-1449. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20458513>.
- Lane, B. G. (1994). Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plants. **The FASEB Journal**, 8:294-301.
- Leonard, B. R. et al., (2011). Soybean green plant malady contributing factors and mitigation. **Louisiana Agriculture Magazine**, 54, pp.32-34. Available at: <http://text.lsuagcenter.com/en/communications/publications/agmag/Archive/2011/Spring/Soyben-Green-Plant-Malady-Contributing-Factors-and-Mitigation.htm>.

- Liu, J. et al., (2008). Protein degradation and nitrogen remobilization during leaf senescence. **J. Plant Physiol.**, 51(1), pp.11-19.
- Martínez-Zaguilán, R. & Sennoune, S. R., (2016). Vacuolar H⁺-ATPase Signaling in Cancer. In Regulation of Ca²⁺-ATPases, V-ATPases and F-ATPase. **Springer**, pp.371-392.
- Mason, H. S. et al., (1988). Proteins homologous to leaf glycoproteins are abundant in stems of dark-grown soybean seedlings. Analysis of proteins and cDNAs. **Plant Mol. Biol.**, 11(6), pp.845-856.
- Miceli, F., Crafts-Brandner, S. J. & Egli, D. B., (1995). Physical Restriction of Pod Growth Alters Development of Soybean Plants. **Crop Science**, 35(4), pp.1080-1085. Available at: <https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/35/4/1080>.
- Mohammadi, P. P. et al., (2012). Organ-specific proteomic analysis of drought- stressed soybean seedlings. **Journal of proteomics**, 75(6), pp.1906-1923. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.12.041>.
- Morrison, L., (2009). Green stem still a mystery. Available at: http://license.icopyright.net/user/viewContent.ace?tag=3.5522%3Ficx_id%3Dsoybean&gest.com%2Fsoybeans%2Fgreen-stem-mystery-0201%2Findex.html.
- Musser, R. L. Kramer, P. J. & Thomas, J. F., (1986). Periods of shoot chilling sensitivity in soybean flower development, and compensation in yield after chilling. **Annals of botany**, 57(3), pp.317-329.
- Nanjo, Y. et al., (2011). Transcriptional responses to flooding stress in roots including hypocotyl of soybean seedlings. **Plant Mol. Biol.**, 77(1-2), pp.129-144.
- Nanjo, Y., Nakamura, T and Komatsu, S, (2013), Identification of Indicator Proteins Associated with Flooding Injury in Soybean Seedlings Using Label-free Quantitative Proteomics, **J, Proteome, Res**, DOI:10.1021/pr4001898
- Nouri, M.-Z . M. K. S. M. & Komatsu, S., (2010). Comparative analysis of soybean plasma membrane proteins under osmotic stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches. **Proteomics**, 10(10), pp.1930-1945. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200900632> [Accessed December 30,2015].

- O'Farrell, H. P., (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J Biol Chem**, 250(10), pp.4007-4021.
- Parker, R. et al., (2006). An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. **Journal of Experimental Botany**, 57(5), pp.1109-1118.
- Payghamzadeh, k., Toorchi, M. and Shobbar, Z.S., (2017). Proteome alteration of soybean as function of pod distortion syndrome. **LEGUME RESEARCH-AN INTERNATIONAL JOURNAL**.
- Rabilloud, T. and Chevalet, M. (2002). Solubilisation of protein in 2D electrophoresis. In: Rabilloud, T. (Ed), Proteome research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification of protein. **Springer-Verlag, Heidelberg, Germany**, pp.20-21. Prorocol2.
- Raeisi, S. et al., (2013). Responses of soybean varieties for abnormality in podding in different planting dates. **J. Pure Appl. Sci. Technol**, 17(1), pp.93-99. Available at:
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.379.7375&rep=rep1&type=pdf>.
- Salavatia, A., Khatoona, A., Nanjoa, Y and Komatsua, S, (2012), Analysis of proteomic changes in roots of soybean seedlings during recovery after flooding, **J, Proteomics** 75:878-893.
- Robinson, S. A., Stewart, G. R. & Phillips, R., (1992). Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures. **Plant Physiology**, 98(3), pp.1190-1195. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1080326&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Scheibe, R., (2004). Malate valves to balance cellular energy supply. **Physiologia Plantarum**, 120(1), pp.21-26.
- Seki, M., Kamei, A., Yamaguchi-Shinozaki, K and Shinozaki, K, (2003), Molecular, drought, Salinity and frost: common and different paths for plant protection, **Curr Opin Biotechnol**, 14:196-199.

- Shanko, A. V. et al., (2003). Proton pumping in growing part of maize root: its correlation with 14-3-3 protein content and changes in response to osmotic stress. **Biochemistry (Moscow)**, 68(12), pp.1320-1326.
- Sözen, E., (2004). Vegetative Storage Proteins in Plants. Anadolu University **Journal of Science and Technology**, 5(1), pp.1-7.
- Stewart, A., (2010). Mad Soy Disease Hits Brazil Farmers. Available at: <http://www.dtnprogressivefarmer.com/dtnag/common/link.do>.
- Toorchi, M. et al., (2009). Proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in soybean roots. **Peptides**, 30(12), pp.2108-2117. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978109003647>.
- Toorchi, M., Dolati, M. and Adalat-zadeh-Aghdam, S. (2014). Differentially Expressed proteins in canola leaf induced by salt stress-a proteomic approach. **International journal of Biosciences**. 5: 433-442.
- Vyavhare, S. S., Way, M. O., Pearson, R. A., et al., (2015). Redbanded Stink Bug (Hemiptera: Pentatomidae) Infestation and Occurrence of Delayed Maturity in Soybean. **Journal of Economic Entomology**, 108(4), pp.1516-1525. Available at: <http://jee.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jee/tov132>.
- Wang, L. et al., (2012). Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of preharvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress. **J. Proteomics**, 75(7), pp.2109-2127. Available at: [file:///d:/PhD Thesis/The All PhD References/Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress.htm](file:///d:/PhD%20Thesis/The%20All%20PhD%20References/Comparative%20proteomics%20analysis%20reveals%20the%20mechanism%20of%20pre-harvest%20seed%20deterioration%20of%20soybean%20under%20high%20temperature%20and%20humidity%20stress.htm).
- Wiebold, B. & Issouri, M., (2010). SoyDoc: Changes in Soybeans., (December). Available at: [http://plantsci.missouri.edu/grains/soybean/mag/Soydoc, Changes in Soybeans.pdf](http://plantsci.missouri.edu/grains/soybean/mag/Soydoc,Changes%20in%20Soybeans.pdf).
- Wilkins, M. R. et al., (1996). Protein identification with sequence tags. **Current Biology**, 6(12), pp.1543-1544.

- Wittenback, W. A., (1983). Effect of pod removal on leaf photosynthesis and soluble protein composition of field grown soybeans. **Plant Physiol**, 73(1), pp.771-775. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16663159>.
- Xing, T., Ouellette, T. & Miki, B., (2002). Towards genomics and proteomics studies of protein phosphorylation in plant-pathogen interaction (review). **Trends Plant Science**, 7, pp.224-230. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11992828>.
- Xu, Z. Z. & Zhou, G. S., (2006). Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis*. **Planta**, 224(5), pp.1080-1090.
- Yin, G. et al., (2009). Mitochondrial damage in the soybean seed axis during imbibition at chilling temperatures. **Plant Cell Physiol**, 50(7), pp.1305-1318. Available at: [file:///d:/PhD Thesis/The All PhD References/Mitochondrial Damage in the Soybean Seed Axis During.pdf](file:///d:/PhD%20Thesis/The%20All%20PhD%20References/Mitochondrial%20Damage%20in%20the%20Soybean%20Seed%20Axis%20During.pdf).
- Yin, Y., Yang, R. & Gu, Z., (2014). Organ-specific proteomic analysis of NaCl-stressed germinating soybeans. **J. Agric. Food Chem.**, 62(29), pp.7233-7244.
- Zelentsov, S. V and Ahmadi, M. R., (2002). Reason study of forming the anomalously developed soybean pods on Iran north, **Electronic journal Investigated in Russia**, 609-615.
- Zhang, Y. et al., (2011). Proteomics study of changes in soybean lines resistant and sensitive to *phytophthora sojae*. **Proteome science**, 9(1), p.1.
- Zimmerman, J., (2010). Record Soybean Planted Area Forecast for 2010-11 Crop. http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Oilseeds%20and%20Products%20Update_Brasilia_Brazil_9-29-2010.pdf. Available at: [http://gain.fas.usda.gov/Recent GAIN Publications/Oilseeds and Products Update Brasilia Brazil 9-29-2010.pdf](http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Oilseeds%20and%20Products%20Update_Brasilia_Brazil_9-29-2010.pdf).
- Zinn, K. E., Tunc-Ozdemir, M. & Harper, J. F., (2010). Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. **Journal of Experimental Botany**, 61(7), pp.1959-68. Available at: <http://jxb.oxfordjournals.org/content/early/2010/03/29/jxb.erq053.abstract> [Accessed December 24, 2015].

Zörb, C., Schmitt, S. & Mühling, K. H., (2010). Proteomic changes in maize roots after short-term adjustment to saline growth conditions. **Proteomics.**, 10(24), pp.4441-4449.

Abstract

Pod distortion syndrome (PDS) is a special type of growth that soybeans remain green during long time after pods maturity. This syndrome can produce many problems at harvest time and it can reduce the plant performance. In this research, the comparison of the protein expression profiles of healthy and infected plants was performed in order to investigation of soybean podding abnormality reasons in Katul cultivar. For this purpose, root samples were selected at R6 vegetative stage via roving method and their protein was extracted by phosphate buffer extraction method. Two-dimensional electrophoresis gel resulted in the appearance of 124 repeatable protein spots. The 34 spots were significantly altered in protein expression based on IF index (induction factor). By performing t-test, 11 protein spots were significant at 5% probability level. Most of these proteins were involved in energy production, metabolism, signal transduction, protein splitting and storage. Glutamate dehydrogenase, melatonin, glycoprotein 31 kDa stem, 14-3-3-like protein, as well as Ros proteins and detoxification including Germin like protein and Thioredoxin, and an unknown protein, showed a reduction of expression in response to this problem. In general, these results indicate that changes in the expression of certain proteins in the root of plants may in turn play a significant role in the appearance of soybean podding abnormality.

Key words: *Glycine max* L., soybean podding abnormality, proteomics



Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis in Agricultural Biotechnology

Two-dimensional gel electrophoresis pattern of root tissue in
soybean pod syndrome

By:

Maryam Aliyary

Supervisors

Dr. Mahdieh Parsaian

Prof. Mahmoud Toorchi

Advisor

Dr. Naser Farrokhi

January 2018