JESI
DOI: 10.22117/JESI.2017.113810

نامه انجمن حشره‌شناسی ایران ۳۲۰-۳۰۵،(۳)۳۷، ۱۳۹٦

JOURNAL OF ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF IRAN
2017, 37 (3),305-320

واکنش پروتئوم لوبیا در اثر تغذیه کنه تارتن دولکه‌ای *Tetranychus urticae* Koch با رویکرد تکنیک پروتئومیکس

مهدی کاکایی

بخش علوم کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، صندوق پستی ٤٦٩٧-١٩٣٩٥، تهران- ایران.

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Mehdikakaei37@gmail.com & M_Kakaei@pnu.ac.ir

چکیده

کنه تارتن دولکه‌ای، *Tetranychus urticae* Koch، از مهمترین آفات لوبیا محسوب می‌گردد که باعث خسارت وسیعی روی این گیاه می‌شود. مطالعه حاضر به منظور بررسی پاسخ پروتئینی گیاه لوبیا در حضور و عدم حضور آفت کنه تارتن دولکه‌ای با استفاده از روش الکتروفورز دوبعدی صورت گرفت. جهت تعیین مقدار کمی پروتئین‌ها از روش برادفورد استفاده گردید. نتایج نشان داد که در اثر تنش تغذیه‌ای آفت، مقدار کمی پروتئین کل نسبت به حالت شاهد کاهش می‌یابد. ٢٦٦ لکه پروتئینی با رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو R-250، از نمونه برگی لوبیا شناسایی گردید. الکتروفورز دوبعدی پروتئین تحت تنش تغذیه‌ای آفت نشان‌دهنده اختلافاتی در شدت بیان لکه‌های پروتئینی برگ نسبت به گیاه در شرایط شاهد بود. به‌طورکلی تعداد هشت لکه پروتئینی نسبت به شاهد دارای کاهش بیان و تعداد چهار لکه بیان بیشتری نشان دادند. اکثر پروتئین‌های شناخته شده دارای ارتباط مستقیم با سیستم دفاعی در برابر تنش بودند و نقش مهمی در این زمینه داشتند. از جمله این پروتئین‌ها HSP، مالات دهیدروژناز و پلی‌فنل‌اکسیداز بودند. این نتایج شواهدی مبنی بر پاسخ سلول‌های مواجه شده با تنش برای ایجاد مقاومت به تغذیه آفت است. نتایج این مطالعه پس از بررسی الگوی باندی به کمک الکتروفورز یک بعدی (SDS-PAGE) نیز تنوع در بیان باندها در شرایط شاهد و شرایط تحت تیمار با آفت کنه تارتن دولکه‌ای را نشان داد.

واژگان کلیدی: الکتروفورز دوبعدی، پروتئین برگ، لوبیا، بیان پروتئین و کنه تارتن دولکه‌ای.

Response of Common Bean proteome to Two-Spotted Spider Mite *Tetranychus urticae* Koch using Proteomics Techniques

Mehdi Kakaei

Department of Agriculture, Payame Noor University, PO BOX 19395- 4697, Tehran-Iran.
*Corresponding author, Email: Mehdikakaei37@gmail.com & M_Kakaei@pnu.ac.ir

Abstract

Two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, is one of the most important pests of Common bean, which causes severe damage on the plants. The purpose of the current study, was determining the bean proteome response to presence and nonpresence of *T. urticae* using Two-dimensional gel electrophoresis. Bradford method was used to determine the amount of proteins. The results showed that under a nutritional stress, total amount of protein was slightly reduced in comparison with the control. 266 protein spots were identified from bean leaf samples painted by Coomassie Brilliant Blue R-250. Two-dimensional electrophoresis of proteins under a pest nutritional stress showed differences in expression level of leaf protein spots on the control. Overally, eight protein spots lower than the control, had decrease of expression and high expression was showed by four spots. Most of the recognized proteins were related to a direct relationship with system defenses against the stress including HSP, malate dehydrogenase and polyphenol oxidase. These results confirms the response of cells exposed to stress for resistance to the pest feeding. The bands pattern with SDS-PAGE, showed the variation in the expression of bands, in control conditions and the conditions under the treatment with Two-spotted spider mite.

Key word: Two-dimensional gel electrophoresis, Leaf protein, *Phaseolus vulgaris*, Protein expression, Two-spotted spider mite.

Received: 13 February 2017, *Accepted*: 12 November 2017

دریافت: ١٣٩٥/١١/٢٤، پذیرش: ١٣٩٦/٨/٢١.

دبیر تخصصی : سعید محرمی‌پور

مقدمه

لوبیا گیاهی با نام علمی *Phaseolus vulgaris* L. و متعلق به تیره Fabaceae است. امروزه لوبیا یکی از مهمترین محصولات با منبع پروتئینی در خیلی از کشورها محسوب می‌شود (La Fuente *et al*., 2011). در بین حبوبات، لوبیا از نظر سطح زیر کشت و ارزش اقتصادی دارای رتبه اول می‌باشد. ارزش بیولوژیک پروتئین لوبیا به علت دارا بودن بسیاری از اسیدهای آمینه ضروری، بالا است و با داشتن ۲۲ درصد پروتئین نقش قابل توجهی در تأمین مواد پروتئینی مورد نیاز انسان خواهد داشت (Mazandarani, 2010). کنه تارتن دولکه‌ای (*Tetranychus urticae*) از جمله مهمترین آفات لوبیا در ایران است (Tahmasebi *et al*., 2011). این آفت از مهمترین کنه‌های خسارت‌زا است که دامنه پراکندگی آن در سراسر جهان وسیع بوده و تاکنون خسارت آن در بیش از ۹۰۰ گونه و ۱۲٤ خانواده گیاهی گزارش شده است (Egas *et al*., 2003). کنه تارتن دولکه‌ای سرعت تولیدمثل بالایی داشته و اولین آفت گلخانه‌ای است که مقاومت به آفت‌کش‌ها را نشان داد و اخیراً این خصوصیات، آن را به صورت آفت خطرناک و کاهش‌دهنده تولید کمی و کیفی محصولات کشاورزی تبدیل کرده است (Tahmasebi *et al*., 2011). دستیابی به منابع مقاومت کنه‌تارتن دولکه‌ای در ارقام لوبیای ایران، اقدام اولیه‌ای برای اصلاح ارقام کنونی و پر محصول است که به این آفت حساس هستند (Tahmasebi *et al*., 2008). پروتئین‌ها به عنوان محصول نهایی ژن‌ها مسئول فرآیندهای سلولی هستند (Toorchi, 2015). اطلاعات بدست آمده از ژنوم موجودات، جهت تعیین ساختار و عمل پروتئین‌ها کافی نمی‌باشد (Klug & Cumming, 2000). اخیراً با گسترش تکنیک‌هایی همچون الکتروفورز دوبعدی امکان تجزیه‌وتحلیل الگوی بیان ژن‌ها در سطح پروتئین میسر شده است. پروتئومیکس دانشی است که امکان مطالعه الگوی بیان کل ژن‌های بیان شده توسط سلول، بافت یا اندامک خاص تحت شرایط محیطی خاص را بوجود می‌آورد (Gygi *et al*., 2000). با استفاده از پروتئومیکس می‌توان هزاران پروتئین متفاوت را جداسازی و اطلاعاتی نظیر نقطه ایزوالکتریک پروتئین، وزن ملکولی و مقدار هر پروتئین را تعیین نمود (Amini & Ehsanpur, 2008). این تکنیک تنها روش توانمندی است که قادر به شناسایی و تعیین تغییرات پس از ترجمه ژنوم است همچنین ابزاری مناسب جهت مطالعه بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌ها است (Zivy & de Vienne, 2000). در تحقیقی Xu *et al*. (2006)، پروتئین‌های برگ گیاه سویا را با کمک الکتروفورز دوبعدی مطالعه کردند و ۵۳ پروتئین را در سایت NCBI شناسایی نمودند. در مطالعه‌ای دیگر، پروتئین بذر رقم پیشرفته لوبیا با کمک الکتروفورز دوبعدی با استفاده از استریپ‌هایی در اسیدیته ٤ تا ۷، ۲۳۷ لکه پروتئینی شناسایی شد که دارای نقش‌های آنتی‌اکسیدانی، ساختاری، تنظیم کنندگی، کاتالیزوری و تنظیم آنزیمی بودند (Natarajan *et al*., 2013). Pereira *et al*. (2014)، توانایی قارچ *Trichoderma harzianum* را برای رشد لوبیا بوسیله روش پروتئومیکس در حضور و عدم حضور دو بیمارگر *Rhizoctonia solani* و *Fusarium solani* بررسی کردند و ٤۸ لکه شناسایی شد که ۱۹ لکه مربوط به برگ و ۲۹ لکه مربوط به ریشه بود. پروتئین‌های شناسایی شده دارای وظایفی از جمله شرکت در متابولیسم، پاسخ دفاعی و پاسخ به تنش اکسیداتیو بودند. Dworak *et al*. (2016)، تغییرات پروتئومیکی گیاه ذرت نسبت به تغذیه کنه تارتن دولکه‌ای و شرایط رطوبتی متفاوت را مطالعه کردند و ابراز کردند که در شرایط ترکیبی این دو تنش میزان بیان پروتئین‌های کربن‌دار کاهش یافته و پروتئین‌های سوپراکسیددیسموتاز، آسکوربات پیروکسیداز، گلوتاتیون ریدوکتاز، پلی‌فنول‌اکسیداز و گلیکول پیروکسیداز افزایش بیان داشتند.

هدف از این مطالعه بررسی پروتئین و مطالعه کمی و کیفی آن، سنجش تغییرات در میزان بیان پروتئین‌ها، تعیین موقعیت و شناسایی عملکرد سلولی در سطح پروتئین‌های لوبیا نسبت به تنش تغذیه‌ای کنه تارتن‌دولکه‌ای با استفاده از تکنیک الکتروفورز دوبعدی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پرورش گیاه میزبان و کلنی کنه تارتن دولکه‌ای

به منظور بررسی بیان پروتئین‌های لوبیا، رقم دانشکده (تهیه شده از ایستگاه ملی تحقیقات لوبیای کشور در خمین) در گلخانه‌ای با دمای میانگین ۲±۲۵ درجه‌سلسیوس در سه تکرار کشت گردید. جهت رشد لوبیاها تمامی مراقبت‌های زراعی به‌عمل آمد. در گلخانه سه تکرار (سه گلدان) در شرایط تغذیه و آلودگی کنه تارتن دولکه‌ای قرار گرفت و سه تکرار دیگر از آسیب و خسارت آفت مذکور مصون ماند. در این آزمایش آلودگی به کنه تارتن دولکه‌ای در مرحله چهار برگی گیاه صورت پذیرفت. جهت آلوده‌سازی گیاهچه‌ها از کلونی آفت کنه تارتن دولکه‌ای که روی گیاه لوبیا در شرایط دمایی مذکور در گلخانه پرورش یافته بود استفاده گردید. کنه‌های تارتن دولکه‌ای پس از گردآوری از گلخانه‌های آلوده به مدت پنج نسل روی این گیاه پرورش داده شد و سپس در هر یک از آزمون‌ها استفاده شدند (Shararbar *et al*., 2016).

استخراج پروتئین و الکتروفورز دوبعدی

به منظور بررسی مقدار کمی پروتئین، ابتدا پروتئین کل از برگ به روش TCA/Acetone استخراج گرفت (Damerval *et al*., 1989). سپس به کمک روش برادفورد به منظور شناسایی غلظت پروتئین (در طول موج ۵۹۵ نانومتر) (Bradford, 1976) از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. پس از استخراج پروتئین‌ها و تعیین میزان کمی آنها به میزان ۰/۲ میلی‌گرم از هر نمونه پروتئینی برداشته و با بافر نمونه مخلوط شد. پروتئین‌های استخراجی در بعد اول الکتروفورز با کمک دستگاه Ettan IPGphor 3 بر اساس شیب بار الکتریکی با استریپ ۱۸cm و در محدوده اسیدیته ٤ تا ۷ جدا شدند. در مرحله دوم نیز جداسازی بر اساس وزن ملکولی به روش (Laemmli *et al*., 1970) با تغییراتی، در ژل ۱۲/۵٪ انجام شد. پس از قرار گرفتن استریپ روی ژل SDS-PAGE دستگاه الکتروفورز ابتدا روی ولتاژ ۵۰ ولت تنظیم شد تا پروتئین‌ها به طور کامل به داخل ژل نفوذ کنند، پس از وارد شدن پروتئین‌ها به داخل ژل پایینی از ولتاژ ۱۵۰ ولت استفاده گردید. برای رنگ‌آمیزی لکه‌های پروتئینی از رنگ کوماسی‌بلو Coomassie Brilliant Blue (R-250) استفاده گردید. محلول‌ها به ترتیب شامل محلول رنگ‌آمیزی (۰/۲۵ گرم پودر کوماسی‌بلو R-250، ۱۲۵ میلی‌لیتر متانول، ۲۵ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و محلول رنگ‌بری (۲۰۰ میلی‌لیتر متانول، ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال و ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر) بودند.

بعد از مرحله SDS-PAGE، ژل‌ها اسکن شدند و به فرمت TIFF ذخیره و با نرم‌افزار Image Master 2D platinium of Melani 6.2 بر پایه بارالکتریکی (نقطه ایزوالکتریک یا pI) و اندازه (جرم مولکولی نسبی) تجزیه و تحلیل شدند. مقایسه لکه‌های پروتئینی از طریق آنالیز آماری آزمون t صورت پذیرفت. بر اساس سطح معنی‌داری ۵٪ و میزان Fold change، لکه‌های معنی‌دار شناسایی شدند. شناسایی پروتئین‌ها با مراجعه به

پایگاه‌های اینترنتی در سایت‌های NCBI و Uniprot از طریق مقایسه نقطه ایزوالکتریک و وزن ملکولی پروتئین‌های شناسایی شده با پروتئین‌های موجود در این پایگاه‌های اطلاعاتی و همچنین گزارشات و مقالات انتشار یافته صورت پذیرفت.

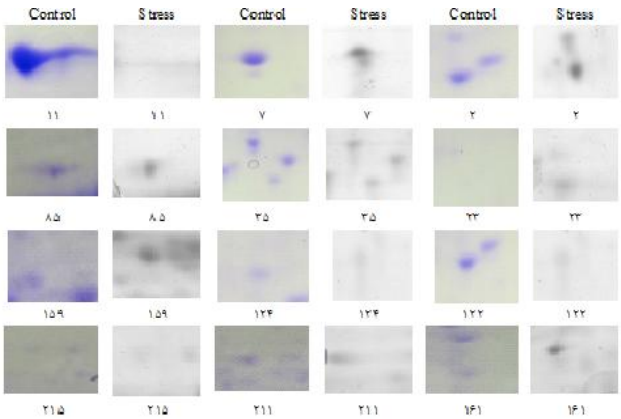
الکتروفورز یک بعدی (SDS-PAGE)

جهت مطالعه الگوی باندهای پروتئینی تشکیل شده حاصل از الکتروفورز پروتئین‌های بافت برگ ژنوتیپ دانشکده لوبیا تحت شرایط شاهد و تحت شرایط تحت تغذیه با آفت کنه تارتن دولکه‌ای از روش الکتروفورز یک‌بعدی نیز استفاده گردید. بعد از استخراج پروتئین بافت برگ گیاه در هر دو شرایط (شاهد و تحت تغذیه با آفت) با روشی که در روش استخراج پروتئین ذکر گردید SDS-PAGE در ژل جداکننده ۱۲/۵ درصد و ژل متراکم‌کننده ۵ درصد، به روش لاملی (Laemmli *et al.*, 1970) با برخی تغییرات انجام پذیرفت. ابتدا مقدار پروتئین نمونه‌ها به روش فوق تعیین و سپس مقدار ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه با غلظت یکسان روی ژل بارگذاری گردید. از پروتئین‌های اوترانسفرین (۷۸ کیلودالتون)، آلبومین گاوی (٦٦ کیلودالتون)، اوآلبومین (٤٥ کیلودالتون)، اکتینیدین (۲۹ کیلودالتون)، بتا-لاکتوگلوبولین (۱۸ کیلودالتون) و لیزوزیم (١٤ کیلودالتون) به عنوان نشانگر در ژل استفاده گردید. الکتروفورز با ولتاژ ۵۰ ولت در ژل متراکم‌کننده به مدت ٤٠ دقیقه و ولتاژ ۱۵۰ ولت در ژل جداکننده به مدت یک‌ونیم ساعت تا رسیدن نشانه رنگی به پایین ژل با دستگاه پاورساپلای (منبع تغذیه) انجام گردید.

نتایج و بحث

با تعیین تفاوت در بیان و تجمع پروتئین‌ها بین گیاهان حساس و متحمل می‌توان قادر به فهم چگونگی سازوکارهای ژنتیکی تحمل به تنش‌های زیستی بود. پس از کمی کردن لکه‌ها توسط نرم‌افزار و انجام آزمون آماری t برای لکه‌های پروتئینی، تعداد ٢٦٦ لکه پروتئینی تکرارپذیر در بین کل لکه‌ها شناسایی شد. تعداد ۱۲ لکه دارای تفاوت بیان معنی‌دار بین دو شرایط شاهد و تنش آفت شناسایی گردید. از ۱۲ لکه دارای تغییر بیانی معنی‌دار، تعداد ٤ لکه دارای افزایش بیان و تعداد ۸ لکه دارای کاهش بیان بودند. شکل ۱ لکه‌های دارای تفاوت معنی‌دار در شرایط شاهد و در شرایط تحت تغذیه را نشان می‌دهد که بر اساس این شکل، اختلاف معنی‌دار حجم لکه‌های بیانی دیده می‌شود. جدول ۱ لکه‌های پروتئینی دارای تغییر بیان معنی‌دار رقم دانشکده لوبیا طی مرحله تنش ناشی از تغذیه کنه تارتن دولکه‌ای لوبیا و شرایط شاهد را نشان می‌دهد (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). جدول ۲ نیز مشخصات پروتئین‌های بیان شده و عملکرد آن‌ها را در سلول، در رقم دانشکده لوبیای مورد مطالعه نشان می‌دهد.

شکل ٤ نمودار پروتئین کل نمونه شاهد و تحت تغذیه آفت کنه تارتن دولکه‌ای را نشان می‌دهد. همانطور که در نمودار دایره‌ای نقش پروتئین‌ها (شکل ۵) دیده می‌شود، ٤١/٦٦ درصد از لکه‌های پروتئینی بیان شده مربوط به پروتئین‌هایی بوده که در پاسخ به تنش بیان شده‌اند. پروتئین‌هایی که در متابولیسم، گلیکولیز و فتوسنتز نقش داشتند هر کدام دارای میزان ١٦/٦٦ درصد بودند و ٨/٣٤ درصد از پروتئین‌ها در سنتز نقش داشتند. در ادامه به توضیح هر کدام از این پروتئین‌ها پرداخته خواهد شد.



شکل ۱- لکه‌های دارای تفاوت معنی‌دار در شرایط شاهد و در شرایط تحت تغذیه آفت کنه تارتن دولکه‌ای.

Fig. 1. The spots have a significant difference in control condition and in under nutrition in two spotted spider mite.

تجزیه کلاستر

بر اساس شکل ٦ تجزیه کلاستر لکه‌های پروتئینی با توجه به خط برش، در سه گروه آماری قرار گرفتند. لکه‌های شماره ١٢٤، ٢١٥، ١٢٢، ٣٥، ٨٥، ٢١١، ١١ و ٢٣ در گروه اول آماری، لکه‌های شماره ٧، ١٥٩ و ٢ در گروه دوم آماری و لکه شماره ١٦١ در گروه سوم آماری جای گرفتند. لکه‌هایی که در کنار هم در یک گروه قرار گرفتند لکه‌های پروتئینی هستند که از نظر بیان، احتمالاً هم‌خانواده بوده و دارای بیان مشابه هستند. لکه شماره ١٦١ در گروه سوم دارای افزایش بیان می‌باشد پس دارای بیان بیشتری در شرایط تنش است. لکه‌های موجود در گروه دوم یعنی لکه‌های شماره ٧، ١٥٩ و ٢ دارای افزایش بیان در شرایط تنش هستند و لکه‌های موجود در گروه اول آماری اکثراً دارای کاهش بیان در شرایط تنش هستند. پس نتیجه‌گیری می‌شود که تجزیه کلاستر به‌عنوان یک روش چندمتغیره آماری، قادر به تفکیک گروه‌های پروتئینی بر اساس افزایش یا کاهش بیان بود.

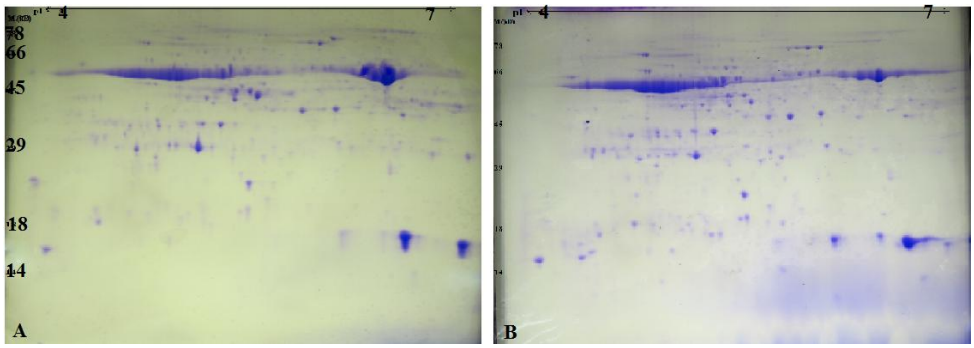
جدول ۱- لکه‌های پروتئینی دارای تغییر بیان معنی‌دار رقم دانشکده لوبیا طی مرحله تنش ناشی از تغذیه کنه تارتن دولکه‌ای لوبیا و شرایط کنترل.

Table 1. Protein spots with significant expression changes in Daneshkadeh common bean cultivar, during the stress caused by feeding two spotted spider mite and control conditions.

Land mark	Match ID	Vol% mean± Standard error		T-test	Fold chain (IF)	Expression type
		Control Stage	Stress Stage			
2	347	0.0802±0.0256	0.236±0.020	0.0058	2.942	Increased
7	354	0.2874±0.058	0.7172±0.0537	0.0056	2.495	Increased
11	358	1.012±0.057	0.093±0.076	0.0006	0.0918	Decreased
23	373	0.080±0.0011	0.0040±0.033	0.0003	0.05	Decreased
35	391	0.1418±0.0153	0.077±0.005	0.01	0.543	Decreased
85	469	0.2034±0.0136	0.1037±0.0083	0.0034	0.509	Decreased
122	525	0.1213±0.0064	0.051±0.0046	0.0008	0.420	Decreased
124	527	0.048±0.0048	0.0211±0.0032	0.0089	0.439	Decreased
159	578	0.053 ± 0.006	0.118 ± 0.014	0.0139	2.226	Increased
161	581	0.0316±0.0019	0.047±0.0027	0.0096	1.487	Increased
211	657	0.0582±0.002	0.0340±0.0035	0.0044	0.584	Decreased
215	661	0.0260±0.0014	0.0119±0.0018	0.0038	0.457	Decreased

نتایج تفسیر باندی حاصل از روش الکتروفورز یک بعدی (SDS-PAGE)

شکل شماره ۷، الگوی باندهای پروتئینی تشکیل شده حاصل از الکتروفورز پروتئین‌های بافت برگ ژنوتیپ دانشکده لوبیا کنترل (A) و شرایط تحت تغذیه با آفت کنه (B) را نشان می‌دهد. بر اساس شکل مذکور تعداد ۲۰ باند پروتئینی در شرایط کنترل (A) وجود دارد و در شرایط تحت تنش تعداد ۱۸ باند پروتئینی قابل تشخیص است. بر اساس تصویر، تراکم باندهای پروتئینی در شرایط کنترل بیشتر از شرایط تحت تغذیه می‌باشد. در باندهای پروتئینی با وزن ملکولی ۲۷ و ۲۸ کیلودالتون در شرایط کنترل باند تشکیل شده است در حالی که در شرایط تحت تغذیه این باندهای پروتئینی موجود نبودند. در وزن‌های ٤٥، ۲۹ و ١٤ کیلودالتون تراکم باند پروتئینی در شرایط کنترل متراکم‌تر از شرایط تحت تنش آفت می‌باشد. مشخص می‌شود مقدار پروتئین در شرایط کنترل بیشتر از شرایط تحت تغذیه است که در شکل ٤، نمودار پروتئین کل نمونه شاهد و تحت تغذیه آفت کنه تارتن دولکه‌ای، این نتیجه‌گیری مورد تأیید و توجه است.



شکل ۲- ژل الکتروفورز حاصل از تکنیک IEF/SDS در اسیدیته ٤ تا ۷ و وزن ملکولی ١٤ تا ۷۸ (کیلودالتون) در شرایط شاهد (A) و در شرایط تحت تغذیه (B).

Fig. 2. Gel electrophoresis technique of IEF/SDS at pH 4 to 7 and Molecular weight 14 to 78 (kDa) in control condition (A) and in under nutrition (B).

پروتئین‌های درگیر در تنش

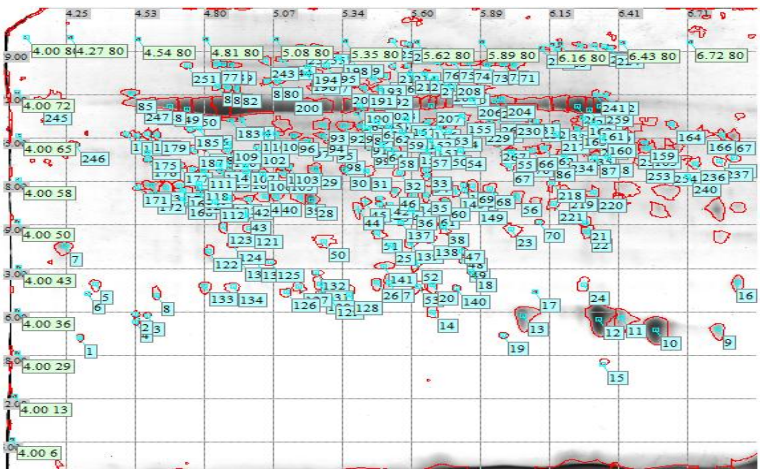
یکی از این پروتئین‌ها، HSP یا پروتئین‌های شوک حرارتی هستند که در این مطالعه در دو لکه شماره ۲ و ۲۱۵ بیان شده است (Raeesi Sadati *et al*., 2014; Mesquita *et al*., 2012). HSPها بخش مهمی از ابزارهای سلولی هستند و از سلول در برابر استرس‌های محیطی محافظت می‌کنند. این پروتئین تقریباً در همه موجودات زنده وجود دارد (Gupta *et al*., 2010). پروتئین‌های شوک حرارتی در واقع زیرخانواده پروتئین‌های خانواده LEA (Late Embryogenesis Abundant) هستند که در ایجاد مقاومت گیاه در برابر تنش نقش دارند (Wang *et al*., 2004). دمای بالا، شوری و استرس می‌تواند باعث دناتوره‌شدن و سلب عملکرد بسیاری از پروتئین‌ها گردد. HSPها و پروتئین‌های LEA، از پروتئین‌ها در برابر دناتوره‌شدن و تاخوردن اشتباه جلوگیری می‌کنند. این عمل برای هر دو دسته پروتئین‌های ساختاری و آنزیمی صورت می‌گیرد. همبستگی مثبت بین مقاومت به تنش و سطح بیان HSPها گزارش شده است (Wang *et al*., 2004). همانطور که از جدول ۲ مشاهده می‌شود، بیان این دو پروتئین بصورت افزایشی بوده است. این موضوع با نتایج محققانی از جمله (Bongani *et al*., 2005; Chenda *et al*., 2009; Xu *et al*., 2006; Kakaei, 2015 & Fatehi, 2009; Wang *et al*., 2004) مطابقت دارد.

جدول ۲- مشخصات پروتئین‌های بیان شده در لوبیای رقم دانشکده.

Table 2. Protein expressed in Daneshkadeh common bean cultivar.

Land mark	Name	pI	MW (kDa)	Organism	Function	Reference
2	Heat shock protein	4.56	39.73	*Triticum aestivum*	Stress response	Raeesi Sadati *et al.*, 2014
7	Calreticulin	4.41	48.59	*Medicago truncatula*	Stress Response	Natarajan *et al.*, 2013
11	Malate dehydrogenase	0.6	39.9	*Zea mays*	Glycolese	La fuente *et al.*, 2011
23	Phosphoglycerate kinase	5.61	56.29	*Isochrysis galbana*	Glycolese	Raeesi Sadati *et al.*, 2014
35	Pectate lyase	5.99	58.73	*Vitis vinifera*	Metabolism	De Carli *et al.*,
85	Chaperonin	4.77	52.46	*Ricinus communis*	Stress Response	Xu *et al.*, 2006
122	RuBisCo large subunit	4.90	52.62	*Phaseolus vulgaris*	Photosynthesis	Pereira *et al.*, 2014
124	RuBisCo	6.39	67.76	*Oryza sativa*	Photosynthesis	Hashimutu & Komatsu 2007
159	Polyphenol oxidase	4.62	48.06	*Vitis vinifera*	Stress Response	De Carli *et al.*, 2011
161	Granule bound starch synthase	6.43	67.60	*Phaseolus vulgaris*	Synthase	Natarajan *et al.*, 2013
211	Legumin	5.64	69.08	*Phaseolus vulgaris*	Metabolism	Natarajan *et al.*, 2013
215	Heat shock Protein	5.15	75.48	*Cueumis sativus*	Stress Response	Mesquita *et al.*, 2012

پروتئین کالرتیکولین (لکه شماره ۷) پروتئینی چندمنظوره است که به یون‌های Ca^{2+} متصل شده و انتقال آن را غیرفعال می‌کند (Nangalia *et al.*, 2013). این پروتئین در وزیکول‌های ذخیره‌ای مرتبط با شبکه آندوپلاسمی فعالیت دارد. Calreticulin به پروتئین‌هایی که دچار تاخوردگی اشتباه شده‌اند، متصل‌شده و از صدور آن‌ها از شبکه آندوپلاسمی به دستگاه گلژی جلوگیری و از این طریق می‌تواند در کاهش استرس نقش داشته باشد (Klampfi *et al.*, 2013). این پروتئین نیز دچار افزایش بیان شده است. این افزایش را می‌توان با عملکرد پروتئین مذکور در کاهش استرس در گیاه لوبیا مرتبط دانست.



شکل ۳- لکه‌های تکرارپذیر در ژل الکتروفورز حاصل از تکنیک IEF/SDS در اسیدیته ٤ تا ۷ و وزن ملکولی ١٤ تا ۷۸ (کیلو دالتون) در نرم‌افزار Image master 2D platinum of melani 6.2.

Fig. 3. Repeatable spots in the gel electrophoresis technique of IEF/SDS at pH 4 to 7 and a molecular weight of 14 to 78 (kDa) in the application Image master 2D platinum of melanin 6.2.

چاپرونین‌ها که شرایط مطلوبی برای تاخوردگی صحیح پروتئین‌های دیگر فراهم نموده و از تجمع آن‌ها جلوگیری می‌نماید، دارای نقطه ایزوالکتریک و وزن ملکولی مشابه با لکه شماره ۸۵ بودند (Xu *et al*., 2006). چاپرون‌ها متعلق به گروه بزرگی از مولکول‌های پروتئینی هستند که در همه موجودات از باکتری‌ها تا انسان و در تمام اجزای سلولی یافت می‌شوند و با اتصال به انواع پروتئین‌ها، در تاخوردگی آن‌ها نقش حیاتی دارند و مولکول‌های همراه نیز نامیده می‌شوند (Fenton & Horwich, 2003). این پروتئین‌ها بیشتر در ارتباط با تنش بوده و در حفاظت سلول در برابر تنش نقش دارند (Crevel *et al*., 2001). به‌طورکلی روند تغییرات این پروتئین به گونه‌ای بوده که در مراحل تحت تنش نسبت به مرحله شاهد دچار افزایش بیان شده و اختلاف معنی‌داری از خود نشان داده است که با توجه به بیان این پروتئین در تنش‌های محیطی از جمله خشکی، شوری، آفات و بیماری‌ها (Askari *et al*., 2006; Fatehi, 2009; Hajhaeidari *et al*., 2005) این نتایج قابل انتظار بوده است.

شکل ٤- نمودار پروتئین کل نمونه شاهد و تحت تغذیه آفت کنه تارتن دولکه‌ای.

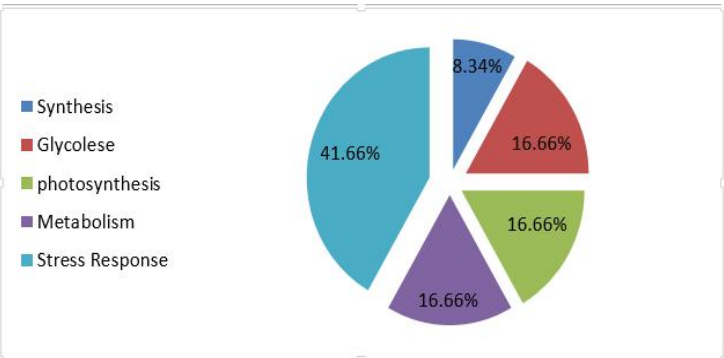
Fig. 4. The graph of total protein control and under nutritional of two-spotted spider mite pest.

لکه شماره ۱۵۹ در رقم دانشکده با وزن مولکولی ٤٨/٠٦ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک ٤/٦٢ مربوط به آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز می‌باشد (Di Carli *et al*., 2011). آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز از جمله آنزیم‌هایی هستند که در اکسیداسیون فنل‌ها به کینون‌ها و تشکیل لیگنین در سلول‌های گیاهی در طول حمله بیمارگرها، تغذیه حشرات، زخم، تنش‌های محیطی و هورمون‌هایی نظیر اتیلن و سالیسیک اسید در گیاه نقش مهمی دارند (Flott *et al*., 1989; Kerby & Somervill, 1989). در مطالعه‌ای Zinovieva *et al*., 1993، فعال شدن سازوکارهای دفاعی در گیاهان و همچنین بازدارنده‌های فعالیت نماتدهای انگل گیاهی را در ارتباط متقابل میزبان- نماتد مورد بررسی قرار داده و ثابت کردند که افزایش مقدار فیتوآلکسین، کاهش تعداد گال و فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز را سبب می‌شوند. در تحقیقی Mohammadi & Kazemi, (2002) نیز در بررسی میزان مقاومت ارقام مختلف گندم به قارچ *Fusarium graminearum* و القای مقاومت فعالیت پلی‌فنل اکسیداز را مورد بررسی قرار دادند. از جمله اثرات دیگر این آنزیم‌ها، تغییراتی در ترکیبات پروتئینی هیدروکسی پرولین موجود در دیواره سلولی است که باعث مقاوم‌سازی آن در مقابل عوامل بیمارگر و سایر تنش‌ها می‌گردد.

پروتئین‌های درگیر در گلیکولیز

لکه شماره ۱۱ پروتئینی به نام مالات دهیدروژناز است (La fuente *et al*., 2011). این پروتئین قبلاً در برنج و گندم مشاهده شده و طول توالی آن در گندم ۳۳۳ آمینواسید است که به طور کامل توالی‌یابی شده است.

مالات دهیدروژناز یکی از آنزیم‌هایی است که در فرآیند گلیکولیز نقش دارد. فعالیت مولکولی آن اکسیدوردوکتازی و فرآیند بیولوژیکی آن گلیکولیز و متابولیسم مالات است (Li *et al*., 2009). همچنین Rinaldesi *et al*. (2011) یکی از وظایف این آنزیم را پاسخ به محرک‌های محیطی دانسته‌اند. بیان این آنزیم در لوبیا رقم دانشکده به صورت افزایشی بوده است که احتمالاً به علت تغذیه کنه تارتن دولکه‌ای از شیره پرورده این پروتئین که نقش ساختاری داشته و به صورت جزئی دارای نقش پاسخ به تنش است، دچار افزایش بیان شده است. در واقع گیاه با افزایش چنین پروتئین‌هایی، سعی بر ایجاد مقاومت نسبت به آفت مذکور داشته است. روند تغییرات این پروتئین به گونه‌ای بوده که در مرحله تحت تغذیه نسبت به مرحله عدم تغذیه کنه تارتن دولکه‌ای، دچار کاهش بیان شده و اختلاف معنی‌داری از خود نشان داده است.



شکل ۵- نمودار درصد لکه‌های پروتئینی با تغییرات بیانی معنی‌دار در رقم لوبیا (براساس عملکرد و نقش آن‌ها).

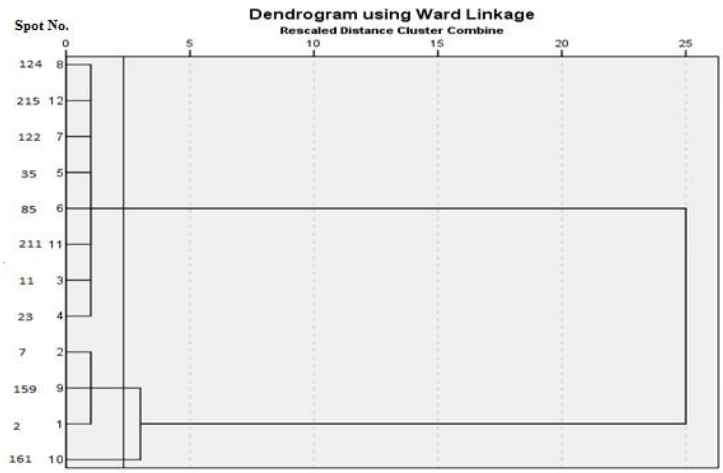
Fig. 5. Diagram of protein spots percent with significant expression changes in common bean (based on performance and their role).

لکه شماره ۲۳ با وزن مولکولی ۵۶/۲۹ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک ۵/۶۱ به احتمال زیاد پروتئینی به نام فسفوگلیسرات کیناز است (Raeisi sadati *et al*., 2014). در حال حاضر در تمام موجودات زنده به عنوان یکی از دو آنزیم تولیدکننده ATP در گلیکولیز است. فسفوگلیسرات کیناز (PGK) آنزیمی است که واکنش برگشت‌پذیر انتقال یک گروه فسفات را از ۱و۳- بیس فسفوگلیسرات (1, 3-BPG) به ADP و تولید ۳- فسفوگلیسرات (3-PG) و ATP می‌کند. این آنزیم نیز مانند همه کینازها یک ترنسفراز و آنزیم اصلی مورد استفاده در گلیکولیز (گام اول مسیر گلیکولیز) است (Zerrad *et al*., 2011). در مطالعه‌ای که توسط Hashimoto & Komatsu (2007) روی برگ برنج در شرایط تنش سرمایی مورد بررسی قرار گرفت، پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش سرمایی شامل روبیسکو، فسفوگلیسرات کیناز، کاتالاز، فروکتوز بیس فسفات آلدولاز و پروتئین مذکور بودند، که در آن آنزیم فسفوگلیسرات کیناز کاهش بیان داشت. در این مطالعه نیز کاهش بیان در آنزیم مذکور مشاهده شد که مطابقت آن را نشان می‌دهد.

پروتئین‌های درگیر در فتوسنتز

لکه‌های شماره ۱۲۲ و ۱۲٤ در رقم مورد مطالعه لوبیا، در فتوسنتز نقش داشتند لکه شما ۱۲۲، به‌طور احتمالی آنزیمی به‌نام ریبولازبیس‌فسفات‌کربوکسیلاز/اکسیژناز مورد شناسایی قرار گرفت. این آنزیم دارای یک

زنجیره ۲۰۱ اسیدآمینه‌ای بوده و توسط ژنی به نام RcaB کد می‌شود. روبیسکو در واقع آنزیمی است که در فرآیند تثبیت ازت، که طی آن کربن موجود در جو توسط گیاهان به مولکول‌های سرشار از انرژی مانند گلوکز تبدیل می‌شود، نقش اصلی و مهمی ایفاء می‌کند (Feller *et al*., 2008; Cooper, 2000). روبیسکو یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های زیستی در کره زمین است. زیرا کاتالیز واکنش‌های شیمیایی اولیه را که توسط آن کربن معدنی وارد زیست کره شده، را برعهده داشته است. روبیسکو (ریبولوز ۱و۵ بی‌فسفات کربوکسیلاز) یک آنزیم اصلی در فتوسنتز گیاه می‌باشد. در گزارشی Walia *et al*., 2007 با مطالعه الگوی بیان ژن‌ها در جو تحت تنش شوری افزایش بیان آنزیم روبیسکو را مشاهده کردند. در این مطالعه روند بیان این آنزیم به صورت کاهشی مشاهده گردید. علت این موضوع را می‌توان چنین بیان کرد که گیاه لوبیا در برابر تنش ناشی از کنه تارتن دولکه‌ای، مقدار فتوسنتز آن کاهش یافته و متقابلاً میزان آنزیم روبیسکو نیز به عنوان آنزیم مهم مؤثر در فتوسنتز کاهش یافته است.



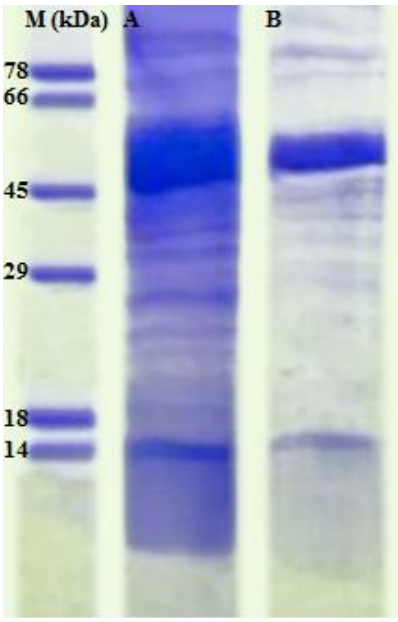
شکل ٦- تجزیه کلاستر لکه‌های پروتئینی بر اساس شاخص Fold chain (IF).

Fig. 6. Cluster analysis of protein stains based on Fold chain (IF) index.

لکه شماره ۱۲٤ پروتئینی به نام زیر واحد بزرگ روبیسکو است (Pereira *et al*., 2014). آنزیم روبیسکو فراوانترین و مهمترین آنزیم حیات می‌باشد. ژن این آنزیم rbcL نام دارد و در پلاستید و کلروپلاست کد می‌شود و در گندم و برنج یافت شده است. این پروتئین یک پروتئین فتوسنتزی است که سطح بیان آن با افزایش استرس از جمله افزایش غلظت نمک کاهش پیدا می‌کند، که در این مطالعه نیز کاهشی بوده است. کاهش فعالیت زیر واحد بزرگ باعث محدودشدن تثبیت CO_2 و نقص تنظیم آنزیم‌هایی می‌شود که وابسته به چرخه کالوین هستند. همین امر سبب انباشتگی ATP و NADPH در کلروپلاست‌ها شده و پروتئین‌هایی که مسئول حفاظت از گیاه در برابر زیان‌های فتواکسیداتیو هستند، کاهش می‌یابند (Mechanic *et al*., 2014).

پروتئین‌های درگیر در متابولیسم

لکه شماره ۳۵ طی جستجو در پایگاه داده‌ها، پروتئینی به نام پکتات‌لیاز شناسایی شد (Raeesi Sadati *et al*., 2014). پکتات‌لیاز آنزیمی درگیر در ایجاد رطوبت و پوسیدگی نرم بافت گیاه است. این پروتئین اکثراً در اواخر رشد گرده تولید می‌شود. پیشنهاد شده است که ژن پکتات لیاز ممکن است برای تجزیه پکتین طی رشد لوله گرده بیان شود. این آنزیم در واکنش تبدیل پنتوز و گلوکورانات شرکت می‌کند Kamen & Woody 2002). روند بیان این پروتئین نیز در مرحله تنش نسبت به مرحله شاهد، کاهش یافته است.



شکل ۷- الگوی باندهای پروتئینی تشکیل شده حاصل از الکتروفورز پروتئین‌های بافت برگ ژنوتیپ دانشکده لوبیا A: کنترل و B: شرایط تحت تغذیه با آفت کنه تارتن دولکه‌ای.

Fig. 7. Pattern of Protein Bands Created from Electrophoresis of Leaf Tissue Proteins in Bean Daneshkadeh A: Control and B: Conditions under Nutrition with two-spotted spider mite Pest.

لکه شماره ۲۱۱، نیز پروتئینی با عنوان لگومین شناسایی گردید (Natarajan *et al*., 2013). در مطالعه‌ای Bakhshi Moqadam *et al*., 2012 ابراز نمودند که گلوبولین نخود از اجزایی با وزن‌های مختلف ملکولی در محدوده ۱۰ تا ۱۵۰ کیلودالتون تشکیل شده است، پروتئین‌های اصلی دانه نخود گلوبولین‌ها و آلبومین‌ها هستند که گلوبولین شامل دو جزء لگومین (11S) و ویسیلین (7S) می‌باشد. لگومین، یا کازئین نباتی، ماده پروتئین شبیه به پروتئین شیر، به دست آمده از لوبیا، نخودفرنگی، عدس و سایر دانه‌های غلات و حبوبات است. این پروتئین پس از تیمار با اسید سولفوریک، اسیدآمینه‌های مانند لگومین، لوسین، تیروزین و گلوتامیک اسید و آسپارتیک اسید می‌دهد (Rubio *et al*., 2013).

پروتئین درگیر در سنتز

لکه شماره ۱٦۱، پروتئینی با عنوان Granule bound starch synthase شناسایی شد (Natarajan *et al*., 2013). این پروتئین از جمله پروتئین‌هایی است که در واکنش ساخت گرانول شرکت دارد و یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز نشاسته نیز می‌باشد (Stiasna *et al*., 2014) روند تغییرات این پروتئین به صورت افزایشی مشاهده شد.

بر اساس نمودار شکل (٤)، میزان پروتئین کل در نمونه تحت تنش ناشی از تغذیه کنه تارتن دو نقطه‌ای، بسیار کمتر از پروتئین کل در مرحله عدم تنش بوده است. این میزان کاهش را می‌توان به تغذیه کنه تارتن دولکه‌ای نسبت داد چرا که مکنده‌ها باعث کاهش پروتئین برگ می‌شوند (Dixon, 1973).

نتیجه‌گیری کلی

پروتئین‌ها نقش بسیار مهمی در پاسخ گیاهان به تنش ایفا می‌کنند چرا که در تغییرات ساختاری و نیز تغییرات متابولیکی گیاه نقش دارند (Valizadeh Kameran *et al*., 2015). در مطالعه‌ای Berenbaulm, (1995)

اثبات نمود که متابولیت‌های اولیه نیز بر ترجیح و عملکرد حشرات روی گیاهان اثر می‌گذارند. به‌عبارت دیگر نسبت اسیدهای آمینه خاص و پروتئین‌ها را می‌توان یک فاکتور دفاعی در نظر گرفت. آنزیم‌های خاص نظیر آنتی‌پروتئینازها که مبنای پروتئینی دارند بر توانایی حشره در استخراج مواد غذایی از ترکیبات گیاهی اثر گذاشته و لذا عامل دفاعی هستند (Green & Ryan, 1972). ارزیابی بیان پروتئین‌ها با کمک الکتروفورز دو بعدی نشان داد که به‌طور کلی پروتئین‌ها در برابر تنش تغذیه‌ای آفت کنه تارتن دولکه‌ای، تغییر بیان دارند. وجود بیشتر پروتئین‌های بیان شده در مطالعه حاضر در گروه پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش، احتمالاً تأثیر این متابولیت‌های اولیه را بر ترجیح و عملکرد حشرات و نقش دفاعی آن‌ها را اظهار می‌دارد.

سپاسگزاری

از همه عزیزانی که جهت انجام گزارش حاضر سهم ارزنده‌ای داشتند به‌ویژه مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه (جناب آقای دکتر علی مصطفایی)، ایستگاه تحقیقات لوبیای کشور در خمین جهت در اختیار قرار دادن بذر این مطالعه و سرکار خانم مهندس هدیه شرربار دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد حشره‌شناسی دانشگاه بوعلی‌سینا قدردانی می‌گردد.

References

Amini, F. & Ehsanpour, A. A. (2008) Study of protein changes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) under salt stress using two dimensional electrophoresis. *Iranian Journal of Plant Biology* 1, 13–24. (In Persian)

Askari, H., Edqvist, J., Hajheidari, M., Kafi, M. & Hosseini Salekdeh, G. (2006) Effect of salinity levels on proteome of Suaeda aegyptica leaves. *Proteomics* 6, 2546–2554.

Berenbaulm, M. R. (1995) The chemistry of defense: theory and oractice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 92, 2–8.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistery Quantities* 72, 248–254.

Bakhsi Moqadam, F., Mortazavi, S. A., Melani, A. & Hashemi, M. (2012) Evaluation of nitrogen fractions diversity and functional specification (*Cicer arietinum* L.) pea protein isolate. *Journal of Food Science and Technology Innovation* 5 (4), 93–103.

Bongani, K. N., Stephen, C., William, J. S. & Antoni, R. S. (2005) Identification of *Arabidopsis* salt and osmotic stress responsive proteins using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 5, 4185–4196.

Cooper, A. & Geoffrey, M. (2000) *The Chloroplast Genome. The Cell: A Molecular Approach*. 2nd ed. ASM Press.

Crevel, G., Bates, H., Huikeshoven, H. & Cotterill, S. (2001) The Drosophila Dpit47 protein is a nuclear Hsp90 co-chaperone that interacts with DNA polymerase alpha. *Journal of Cell Science* 114 (11), 2015–2025.

Chanda, A., Roze, L. V., Kang, S., Artymovich, K. A., Hicks, G. R. & Raikel, N. (2009) A key role for vesicles in fungal secondary metabolism. *PNAS* 106: 19533–19538. [PMC free article] [PubMed]

Damerval, C., Vienne, D., Zivy, M. & Thiellement, H. (1986) Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 7, 52–54.

Di Carli, M., Zamboni, A., Enrico, Pe. M., Pezzotti, M., Lilley, S., Benvenuto, E. & Desiderio, A. (2011) Two-Dimensional Differential in Gel Electrophoresis (2D-DIGE) Analysis of Grape Berry Proteome during Post harvest Withering. *Journal of Proteome Research* 10 (1), 429–446.

Dixon, A. F. (1973) Biology of aphids. The institute of biology studies. No 44. *Edward Avnold Ltd londoni* 52.

Dworak, A., Nykiel, M., Walczak, B., Miazek, A., Szworst-Łupina, D., Zagdańska, B. & Kiełkiewicz, M. (2016) Maize proteomic responses to separate or overlapping soil drought and two-spotted spider mite stresses. *Planta* 244, 939–960.

Egas, M., Norde, D. J. & Sabelis, M. W. (2003) Adaptive learning in arthropods: spider mites learn to distinguish food quality. *Experimental Applied Acarology* 30, 233–247.

Fatehi, F. (2009). Evaluation of long-term response to salinity in Hordeum using Proteomics. PhD thesis. Tehran University, Tehran, Iran.

Feller, U., Anders, I. & Mae, T. (2008) Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *Journal of Experimental Botany* 59 (7), 1615–24.

Fenton, W. A. & Horwich, A. L. (2003) Chaperonin-mediated protein folding: fate of substrate polypeptide. *Quarterly Reviews of Biophysics* 36 (2), 229–56.

Flott, B. E., Moerschbacher, B. M. & Reisener, H. (1989) Peroxidase isoenzyme patterns of resistant and susceptible wheat leaves following stem rust infection. *New Phytologist*111, 413–421.

Green, T. R. & Ryan, C. A. (1972) Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* 175, 776–777.

Gupta, A. K. & Govindarajan, V. (2010) Knowledge Flows within the Multinational Corporation. *Strategic Management Journal* 21, 473–496.

Gygi, S. P., Rist, B. & Aebersold, R. (2000) Measuring gene expression by quantitative proteome analysis. *Current Opinion Biotechnology* 11 (4), 396–401.

Hajheidari, M., Abdollahian-Noghabi, M. & Askari. H. (2005) Proteome analysis of sugar beet leaves under draught stress. *Proteomics* 5, 463–99.

Hashimoto, M. & Komatsu, S. (2007) Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress. *Proteomics* 7, 1293–1302.

Herbert, B. (1999) Advances in protein solubilization for two- dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 2, 660–663.

Kakaei, M. (2015) Screening and Identification of Resistance and Susceptibility factors in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Towards Alfalfa Weevil (*Hypera postica* Gyll.) with Bioassay and Proteomics. Thesis of Doctor of Philosophy in Plant Breeding, the field Molecular Genetics in Bu-Ali Sina University.

Kamen, D. E. & Woody, R. W. (2002) Folding kinetics of the protein pectate lyase C reveal fast-forming intermediates and slow proline isomerization. *Biochemistry* 41 (14), 4713–4723.

Kerby, K. & Somerville, S. (1989) Enhancement of specific intercellular peroxidases following inoculation of barley with *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35, 323–337.

Klampfi, T., Gisslinger, H., Harutyunyan, A. S., Nivarthi, H., Rumi, E., Milosevic, J. D., Them, N. C., Berg, T., Gisslinger, B., Pietra, D., Chen, D., Vladimer, G. I., Bagienski, K., Milanesi, C., Casetti, I. C., Sant Antonio, E., Ferretti, V., Elena, C.,

Schischlik, F., Cleary, C., Six, M., Schalling, M., Schalling, M., Schonegger, A., Bock, C., Malcovati, L., Pascutto, C., Superti-Furga, G., Cazzola, M., Kralovics, R. (2013) Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *New England Journal Medicine* 369 (25), 2379–2390.

Klug, W. S. & Cumming, M. R. (2000) *Concepts of genetics*. Sixth edition. Prentice Hall Inc. New Jersey.

La Fuente, M. D., Borrajo, A., Bermúdez, J., Lores, M., Alonso, J., López, M., Santalla, M., De Ron, A. M., Zapata, C. & Alvarez, G. (2011) 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *Proteomics* 74 (2), 262–267.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Li, C., Fang, B., Yang, C., Sbi, D. & Wang, D. (2009) Effects of varions salt-alkaline mixed stresscs on the stat of nineral elemets in nutrient solution and the growth of alkali resistant halophyte chloris virgatn. *Journal of plant nutrition* 32 (7), 1137–1147.

Mazandarani, A. (2010) Genetic diversity in seed storage proteins in beans Iranian part of the collection. Agricultural Biotechnology Master's Thesis of Payame Noor University. (In Persian)

Mesquita, R. O., de Almeida Soares, E., Gonçalves de Barros, E. & Ehlers Loureiro, M. (2012) Method optimization for proteomic analysis of soybean leaf Improvements in identification of new and low-abundance proteins. *Genetics and Molecular Biology* 35 (1), 353–361.

Mohammadi, M. & Kazemi, H. (2002) Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science* 162, 491–498.

Mechanic, M., Fotovat, R. & Moradi Hagh-go, L. (2014) Comparison of bioinformatics of large and small subunits of Ribulose–1,5–bisphosphate Carboxylase (Rubisco) enzymes in several plant families. First International Congress and 13th Genetic Congress of Iran. CIGS 13–0567.

Nangalia, J., Massie, C. E., Baxter, E. J., Nice, F. L., Nangalia, J., Massie, C. E., Baxter, E. J., Nice, F. L., Gundem, G., Wedge, D. C., Avezov, E., Li, J., Kollmann, K., Kent, DG., Aziz, A., Godfrey, A. L., Hinton, J., Martincorena, I., Van Loo, P., Jones, A.V., Guglielmelli, P., Tarpey, P., Harding, H., P., Fitzpatrick, J. D., Goudie, C. T., Ortmann, C. A., Loughran, S. J., Raine, K, Jones, D. R., Butler, A. P., Teague, J. W., O'Meara, S., McLaren, S., Bianchi, M., Silber, Y, Dimitropoulou, D, Bloxham, D., Mudie, L., Maddison, M., Robinson, B., Keohane, C, Maclean, C, Hill K, Orchard, K, Tauro, S., Du M. Q., Greaves, M, Bowen, D., Huntly, B. J, Harrison, C. N, Cross, N. C., Ron, D., Vannucchi, A. M., Papaemmanuil, E., Campbell, P. J. & Green, A. R. (2013). Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *NewEngland Journal of Medicine* 369, 2391–2405.

Natarajan, S. S., Pastor-Corrales, M. A., Khan, F. H. & Garrett, W. M. (2013) Proteomic Analysis of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Journal of Basic & Applied Sciences* 9, 424–437.

Pereira, J., Queiroz, R. M. L., Charneau, S. O., Felix, C. R., Ricart, C. A. O., Lopes da Silva, F., Steindorff, A. S., Ulhoa, C. J. & Noronha, E. F. (2014) Analysis of Phaseolus vulgaris Response to Its Association with *Trichoderma harzianum*

(ALL-42) in the Presence or Absence of the Phytopathogenic Fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. *PLOS ONE* 9(5), e98234. Doi: 10.1371.

Raeisi sadati, S. E., Gedeh Kahrizi, S. & Ebadi, A. (2014) Expression of proteins induced the leaves of two wheat varieties under cadmium and mercury using two-dimensional electrophoresis technique. *Journal of Crop Production and Processing* 5 (18), 233–243. (In Persian)

Rinalducci, S., Egidi, M. G., Mahfoozi, S., Godekahriz, S. J. & Zolla, L. (2011) The influence of temperature on plant development in a vernalization- requiring winter wheat: A 2-DE based proteomic investigation. *Proteomics* 74, 643–659.

Rubio, L. A., Perez, A., Ruiz, R., Guzman, M. A., Aranda-Olmedo, I. & Clemente, A. (2013).Characterization of pea (*Pisum sativum*) seed protein fractions. *Journal Science Food Agriculture* (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa. 6250.

Stiasna, K., Presinszka, M., Vyhnanek, T., Trojan, V., Mrkvicova, E., Hrivna, L. & Havel, L. (2014) Granule-bound starch synthase and endosperm mealiness correlation in wheat (*Triticum aestivum* L.) with nonstandard colored caryopses. *Mendel Net*, 479–483 pp.

Shararbar, H., Kakaei, M. & Safarolahi, M. (2016).Study of the mechanisms and protein expression associated with the resistance of eleven eggplant genotypes to Tetranychus urticae. *Iranian Journal of Plant Protection Science* 47 (2), 209–218.

Tahmasebi, Z., Bihamta, M. R., Hossein-zadeh, A., Saboori, A., Kosar, A. S. & doori, H. R. (2008) Response of Common Bean Genotypes to Two-Spotted Spider Mite (*Tetranychus urticae* Koch) in Greenhouse and Field. *Seed and Plant Journal* 2 (25), 329–348. (In Persian)

Tahmasebi, Z., Hossein-zadeh**, A., Bihamta, M. R. & Saboori, A.** (2011) Seedling resistance of common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes to two spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) (Acari: Tetranychidae). *Journal of Science Agriculture* 5, 73–78. (In Persian)

Toorchi, M. (2015) The Response of Rice Root to Time Course Water Deficit Stress-Two Dimensional Electrophoresis Approach. *Journal of Crop Eco physiology* 3 (35), 371–386. (In Persian)

Valizadeh kamran, R., Toorchi, M., Moghaddam, M. & Mohammadi, H. (2015) Proteomic Analysis of Spring Barley Leaves under Short Term Cold Stress. *Genetic Engineering and Biosafety Journal* 1, 67–78. (In Persian)

Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. & Altman, A. (2004)Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Science* 9, 244–252.

Walia, H., Wilson, C., Zeng,L., Ismail, A. M., Condamine, P. & Close, T. J. (2007) Genome-wide transcriptional analysis of salinity stressed *japonica* and *indica* rice genotypes during panicle initiation stage. *Plant Molecular Biology* 63 (5), 609–623.

Xu, Ch., Garrett, W. M., Sullivan, J., Caperna, T. J. & Natarajan, S. (2006) Separation and identification of soybean leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Photochemistry* 67, 2431–2440.

Zerrad L., Merli A., Schroder G. F., Varga A., Graczer E., Pernot, P., Round, A., Vas, M. & Bowler, M. W. (2011) A spring-loaded release mechanism regulates domain movement and catalysis in phosphoglycerate kinase. *Journal of Biological Chemistry* 286 (16), 14040–14048.

Zivy, M. & de Vienne, D. (2000) Proteomics: A link between genomics, genetics and physiology. *Plant Molecular Biology* 44, 575–580.

Zinovieva, R. D., Tomarev, S. I. & Piatigorsky, J. (1993) Aldehydrogenase-derived crystallins of squid and octopus. Specializationfor lens expression. *Journal Biological Chemistry* 26, 11449–11455.