



## مطالعه تغییرات پروتئین گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.) در شرایط نرمال و تحت تنش حاصل از تغذیه سرخرطومی برگ یونجه

مهدی کاکایی<sup>۱</sup>، حجت الله مظاهری لقب\*<sup>۲</sup>، علی مصطفایی<sup>۳</sup>

دانش آموخته دوره دکتری اصلاح نباتات، ژنتیک مولکولی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

استاد مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

DOI: 10.22103/jab.2017.1668

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۱۴، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۴

### چکیده

استفاده از ارقام مقاوم از جمله مطمئن‌ترین و سودمندترین روش‌های مبارزه با آفات و از جمله سرخرطومی برگ یونجه (*Hypera postica* Gyll.) می‌باشد. پس از بررسی‌های مزرعه‌ای و گلخانه‌ای، در نهایت، ژنوتیپ نفرش ۴۲ برای انجام مطالعات مولکولی و با هدف بررسی تفاوت الگوی بیان پروتئین‌ها طی دو مرحله تنش و عدم تنش نسبت به سرخرطومی برگ یونجه، انتخاب گردید و مورد ارزیابی قرار گرفت. تغییرات در بیان پروتئین‌ها با استفاده از ژل‌های الکتروفورز دوبعدی مطالعه شدند. تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به مؤلفه اصلی و تجزیه تابع تشخیص مورد بررسی‌های آماری قرار گرفتند. نتایج نشان داد که از مجموع ۲۱۸ نقطه پروتئینی تکرارپذیر، ۱۱ نقطه پروتئینی، تغییر بیان داشتند. بیشترین پروتئین‌های بیان شده با الگوی بیان افزایشی در ژنوتیپ نفرش ۴۲، مربوط به گروه خاصی از پروتئین‌ها بودند که در پاسخ به تنش ایجاد شده توسط آفت، به میزان ۴۵/۴۶٪ تغییرات داشتند. از نقطه نظر بیان پروتئینی، تجزیه خوشه‌ای سبب تقسیم پروتئین‌ها به سه خوشه اصلی شد که بیانگر وجود پروتئین‌هایی با بیان مشابه در هر خوشه است. لذا، حضور همه آنها در مسیر بیولوژیکی مشترکی ثابت شد. تجزیه تابع تشخیص، نتایج حاصل از خوشه‌بندی را ۱۰۰٪ تأیید کرد که نشان از انطباق داده‌های پروتئینی با شرایط آزمایش بود. نتیجه کلی این که با استفاده از نرم‌افزار و تجزیه‌های آماری، به سادگی می‌توان تغییرات بیان معنی‌دار ناشی از خسارت آفت سرخرطومی برگ در یونجه را در سطح پروتئوم مورد ارزیابی قرار داد و شاخص تغییرات را مشخص و متعاقب آن از مهندسی ژنتیک برای افزایش سطح مقاومت گیاه مورد مطالعه بهره‌برداری نمود.

واژگان کلیدی: آفت سرخرطومی برگ یونجه، تجزیه کلاستر، الکتروفورز دو بعدی، بیان پروتئین.

## مقدمه

تحلیل روابط ژنتیکی بین افراد استفاده از الگوریتم‌های آماری چند متغیره است. در تکنیک‌های تجزیه و تحلیل چند متغیره، از تجزیه هم‌زمان چندین متغیر برای بررسی روابط بین افراد استفاده می‌شود. این تکنیک‌ها امروزه به‌طور گسترده‌ای برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی داده‌های مختلف از قبیل داده‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی یا نشانگرهای ملکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Mohammadi and Prasanna, 2003). در این تکنیک‌ها، پیرامون میانگین و یا واریانس یک متغیر و یا رابطه دو متغیر بحث نمی‌شود بلکه در تجزیه چندمتغیره در ارتباط با روابط هم‌زمان متغیرها بحث می‌گردد. در واقع، پیرامون کوواریانس‌ها و همبستگی‌های میان سه متغیر یا بیشتر سخن گفته می‌شود. در یک مطالعه (Zali et al., 2011)، تجزیه داده‌های حاصل از ژل‌های الکتروفورز دوبعدی با استفاده از روش‌های آماری چندمتغیره انجام شد که در نتیجه، روش آماری مطلوبی جهت تعیین شاخص تغییرات معرفی گردید. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، تجزیه خوشه‌ای و تجزیه تابع تشخیص از جمله روش‌های آماری چند متغیره‌ای هستند که در تجزیه ژل‌های دوبعدی استفاده می‌شوند. خوشه‌بندی، به گروه‌بندی پروتئین‌ها بر مبنای معیار مورد نظر می‌پردازد. نظر به این‌که داده‌های پروتئومیکی دارای متغیرهای متعددی هستند، استفاده از روش تجزیه آماری چند متغیره که می‌تواند هم‌زمان همه نقاط پروتئینی موجود را مورد

آفت سرخرطومی برگ یونجه (*Hypera postica* Gyll.) از جمله تنش‌های محدود کننده در تولید یونجه در شرایط ایران محسوب می‌شود (Mazahery-Laghab, 2003). این آفت از طریق تغذیه از شاخه و برگ یونجه، می‌تواند چین اول آن را به طور کلی نابود کند و باعث محدودیت تولید علوفه گردد (Karimi, 1989). بنابراین، شناسایی پروتئین‌های عامل مقاومت و نیز تشخیص ارقام مقاوم به سرخرطومی برگ یونجه می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی، از جمله روش‌های افزایش عملکرد این گیاه به حساب آید (Danilson et al., 1989). امروزه با گسترش تکنیک‌هایی چون الکتروفورز دوبعدی امکان تجزیه الگوی بیان ژن‌ها در سطح پروتئین میسر گردیده است و در واقع، پروتئومیکس دانشی است که امکان بررسی الگوی بیان کل ژن‌های بیان شده در سطح پروتئوم را فراهم می‌کند (Gygi et al., 2000). بررسی‌های هدفمند با استفاده از آنالیزهای مولکولی توام با بکارگیری تکنیک‌های آزمایشگاهی، مخصوصاً در تعاملات مقاومت به تنش‌های زیستی و شناسایی پروتئین‌های مربوطه به عمل آمده است (Khezri, 2013; Saiari et al., 2015). تجزیه داده‌های پروتئومیکی با دارا بودن متغیرهای زیاد نیاز به روش‌های چند متغیره دارد که امکان تجزیه آماری هم‌زمان چندین متغیر را فراهم می‌کنند (Zali et al., 2011). از جمله راهکارهای طبقه‌بندی ژرم‌پلاسم و تجزیه و -

می‌تواند بستر مناسبی را در جهت بهبود صفت مقاومت به سرخرطومی در یونجه فراهم کند. در واقع، هدف این گزارش مطالعه پروتئین‌های ژنوتیپ تفرش ۴۲ در نمونه‌های شاهد و آلوده به آفت سرخرطومی برگ یونجه و ارتباط آن‌ها با مقاومت و همچنین، شناسایی لکه‌های پروتئینی با تغییرات بیانی معنی‌دار با کمک تکنیک الکتروفورز دوبعدی می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

به منظور بررسی ارتباط بیان پروتئین‌ها در شرایط تغذیه و عدم تغذیه سرخرطومی برگ یونجه، ژنوتیپ تفرش ۴۲ بر اساس جمع‌بندی نتایج مزرعه‌ای و گلخانه‌ای (کلیه نتایج در اینجا ذکر نشده‌اند)، مورد مطالعات الکتروفورز دوبعدی قرار گرفت. نحوه آلوده‌سازی این ژنوتیپ به این گونه بود که بذر آن در گلدان‌های جداگانه‌ی کشت گردید. برخی از گلدان‌ها (سه گلدان به مثابه سه تکرار) از آسیب آفت سرخرطومی مصون بودند و سه گلدان (سه تکرار) دیگر با استفاده از لاروهای سن سوم آلوده و مورد تغذیه واقع شدند. بافت سبز قسمت هوایی ژنوتیپ تحت تغذیه و عدم تغذیه سرخرطومی در مرحله قبل از گل‌دهی بطور هم‌زمان برداشت و بلافاصله در ازت مایع قرار گرفت و تا زمان انجام تجزیه-های بیوشیمیایی در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس ۵ گرم از هر نمونه برگی تحت تغذیه آفت سرخرطومی و ۵ گرم نیز بدون

ارزیابی قرار دهد و تفاوت‌های کلی بیان ژن را بین گروه‌های مختلف درگیر در آنالیز را شناسایی نماید روش مطلوب و مؤثری است (Zali et al., 2011; Pedreschi et al., 2008). روش تجزیه مؤلفه‌های اصلی<sup>۱</sup> یکی از الگوهای تشخیص و شناسایی در یک مجموعه اطلاعات می‌باشد. در این روش اطلاعات را بر اساس شباهت‌ها و تفاوت‌های آن‌ها بیان می‌کنند. از آن جا که از اطلاعات در ابعاد بالا، نقشه و طرح خاص در داده‌ها را به سختی می‌توان پیدا کرد، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در این زمینه می‌تواند مؤثر باشد. در حقیقت، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، ارتباط بین داده‌ها را کشف می‌کند و در جایی که نمایش گرافیکی به دلیل حجم بالا و پیچیدگی تصاویر وجود ندارد، تجزیه اجزای اصلی یک ابزار نیرومند برای تجزیه و تحلیل اطلاعات محسوب می‌شود. در مطالعه نمونه برگ دو رقم گندم تحت تنش کادمیوم و جیوه، مقایسه الگوهای پلی‌پپتیدی حاصل از الکتروفورز دوبعدی، تأثیر فلزات کادمیوم و جیوه در سنتز پروتئین‌های گیاه تحت تنش گزارش شد (Raeesi Sadati et al., 2016). در مطالعه حاضر، کاربردهای آماری نرم‌افزارهای آنالیز ژل مورد توجه قرار می‌گیرد. پس از شناخت پروتئین‌های پاسخگو و بررسی نقش احتمالی آن‌ها، نتایج حاصل از این بررسی در کنار سایر تکنیک‌های مولکولی و شناسایی دقیق‌تر اثرات تنش سرخرطومی روی گیاه یونجه،

1- Principal component analysis

استریپ‌هایی با pH خطی ۷-۴ بودند. برای متورم نمودن ژل‌ها، میزان ۳۶۰ میکرولیتر از محلول متورم‌سازی<sup>۴</sup> (جدول ۱) که حاوی ۰/۸ میلی‌گرم پروتئین (انتخاب محلول متورم‌سازی مطلوب بستگی به میزان محلولیت پروتئین نمونه مورد استفاده دارد) بود به داخل شیار موجود در سینی متورم‌سازی قرار گرفت. IPG Buffer و DTT قبل از استفاده به محلول استوک متورم‌سازی اضافه شدند و ژل نواری<sup>۵</sup> روی محلول حاوی پروتئین قرار گرفت. پس از آماده‌شدن دستگاه، ژل متورم‌شده در محل مربوطه در تانک الکتروفورز دستگاه مولتی فور II ساخت شرکت آمرشام بیوساینس<sup>۶</sup> قرار گرفت و برنامه آن به صورت گرادیانت تنظیم گردید (جدول ۲). در این مطالعه، جهت الکتروفورز یک ژل نواری ۱۸ سانتی‌متری با دامنه pH ۴ تا ۷، به‌طور متوسط، نیاز به ۵۹ هزار ولت ساعت بود. این انرژی طی شش مرحله تأمین گردید. در این مرحله پس از اتمام مراحل بعد اول (IEF) و تفکیک پروتئین‌ها بر حسب بار الکتریکی، لازم است تا اثر بار به نوعی خنثی شده و پروتئین‌ها تنها بر حسب وزن ملکولی در بعد دوم الکتروفورز تفکیک شوند.

تغذیه آفت سرخرطومی برگ یونجه، در هاون چینی در حضور نیتروژن مایع، به طور کامل آسیاب و پودر یکنواختی حاصل گردید. استخراج پروتئین از بافت برگ بر اساس روش *et al.* (1986) Damerval با اندکی تغییر انجام شد. مقادیر ۲۰۰ میلی‌گرم از پودر حاصل از نمونه آلوده و غیرآلوده، به میکروتیوب‌های دو میلی-لیتری منتقل شد. پنج برابر حجم نمونه گیاهی محلول استخراج تری کلرواستیک اسید<sup>۱</sup> (TCA) ده درصد، در استونی که در فریزر در دمای ۲۰- درجه سلسیوس سرد شده بود، به پودر حاصله اضافه گردید و بافت له شده چندین بار ورتکس گردید. سپس به مدت یک ساعت در ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفت. نمونه‌های پروتئینی به سانتریفیوژ یخچال‌دار منتقل و در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه با دور  $14000 \times g$  سانتریفیوژ گردید. مایع رویی با دقت دور ریخته شد و به رسوب باقی‌مانده در میکروتیوب، محلول شستشو<sup>۲</sup> (۵۰ میلی‌لیتر Acetone بعلاوه ۰/۱۵ گرم DTT<sup>۳</sup>) اضافه گردید. مواد باقی مانده در میکروتیوب سوسپانسیون شدند. سپس میکروتیوب‌های حاوی پروتئین به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفتند تا پروتئین‌های موجود در میکروتیوب (که مجدد سانتریفیوژ شده‌اند) به طور کامل رسوب کنند. نهایتاً، نمونه‌های پروتئینی در دمای ۴°C- خشک شد. pH بهینه مورد نیاز در این تحقیق

<sup>4</sup>- Rehydration

<sup>5</sup>- Immobilized pH gradient Strip

<sup>6</sup>- Amersham Bioscience

<sup>1</sup>- Tricolor Acetic Acid

<sup>2</sup>- Washing Solution

<sup>4</sup>- Dithio Threitol

جدول ۱- مواد لازم جهت تهیه محلول متورم سازی با حجم نهایی ۳۰ میلی لیتر.

**Table 1- The required materials for the preparation swelling agent solution with a final volume of 30 ml.**

مقدار Amount	نوع Type
12 gr	اوره Urea
0.5 gr	چپس CHAPS
200 µl in Ethanol	آبی برموفنل بلو Blue bromophenol
25 ml	آب دیونیزه (دو بار تقطیر) DH2O

جدول ۲- برنامه الکتروفورز IEF برگ یونجه.

**Table 2- IEF electrophoresis applications alfalfa leaves.**

ردیف Row	مراحل Stage	ولتاژ (ولت) Voltage (V)	زمان (ساعت) Time (h)	توان (وات) Power (w)	جریان (میلی- آمپر) Current (mA)
1	Gradient	500	1	5	2
2	Stop	500	1	5	2
3	Gradient	300	1	5	2
4	Stop	300	2	5	2
5	Gradient	800	4	5	2
6	Stop	800	3	5	2

در لوله آزمایش درپوش دار ریخته شد. نوارهای IPG در محلول متعادل سازی اول که حاوی DTT ۱٪ بود، گذاشته و به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس محلول اول کاملاً دور ریخته شد و نوارها با آب مقطر دوبار تقطیر شسته شدند. سپس نوارها در محلول دوم حاوی یدواستامید ۰.۵٪ وزنی/حجمی به جای DTT، قرار داده شدند و پس از آن،

به همین منظور، نوار IPG بعد اول طی دو مرحله در محلول متعادل کننده SDS-PAGE قرار داده شد. برای هر نوار ۱۰ میلی لیتر محلول متعادل سازی از فریزر بیرون آورده شد، و به دمای اتاق رسید. این محلول شامل گلیسرول ۳۰٪، اوره ۶ مولار، تریس ۵۰ میلی مولار با pH ۷، SDS ۴٪، DTT ۱٪، برموفنول بلو ۰.۰۲٪/۰.۰۲٪ بود. سپس به دو قسمت مساوی ۵ میلی لیتری تقسیم و

در تعیین میزان کاهش یا افزایش بیان هر لکه پروتئینی مورد استفاده قرار گرفت.

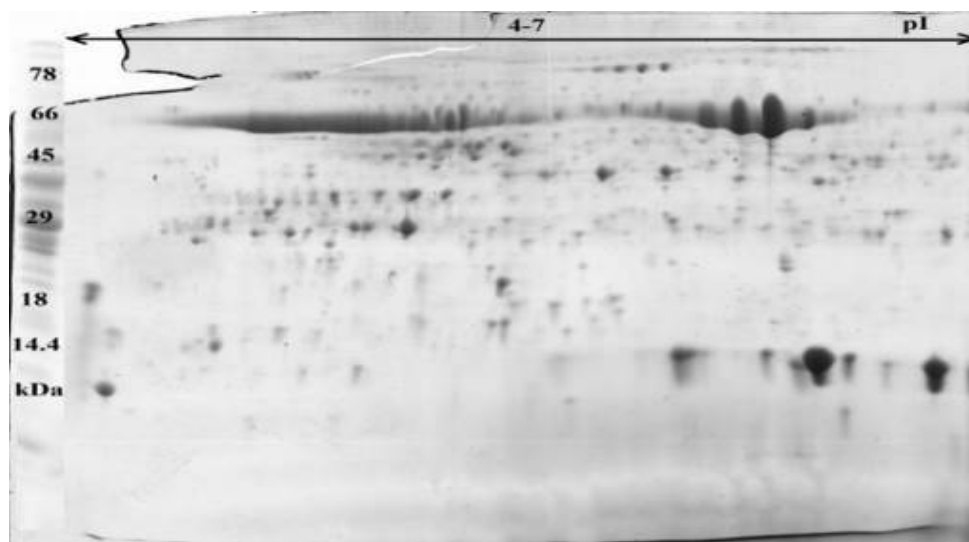
### نتایج و بحث

در شکل‌های ۱ و ۲ نتایج الگوی الکتروفورزی در ژل دوبعدی آورده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود وزن مولکولی پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز همزمان نشانگرهای پروتئینی استاندارد<sup>۲</sup> مشخص و در نرم‌افزار Melanie 6.2 تخمین زده شد. نقطه ایزوالکتریک نیز برای هر لکه پروتئینی با اندازه-گیری مهاجرت لکه روی نوار ۱۸ سانتی‌متری IPG با محدوده pH ۷-۴ خطی در نرم‌افزار مشخص شد. هر لکه پروتئینی با تغییر بیان معنی-دار، با در دست داشتن وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک و با جستجو در مقالات مرتبط در این زمینه، بانک‌های اطلاعاتی و سایت Uniprot، مورد شناسایی احتمالی قرار گرفت (جدول ۴). روند تغییرات این پروتئین‌ها به گونه‌ای بوده که در مرحله تحت تغذیه نسبت به مرحله عدم تغذیه سرخرطومی، دچار افزایش بیان شده و اختلاف معنی‌داری از خود نشان داده است.

محلول به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. ژل‌ها پس از آماده شدن با دستگاه اسکنر مدل Image Scanner III ساخت شرکت فارماسیا با فرمت Tiff اسکن و ذخیره شدند. مقایسات برای هر یک از جمعیت‌ها تحت تنش زیستی آفت سرخرطومی برگ یونجه و فاقد تنش زیستی انجام گرفت. برای بررسی کمی و کیفی لکه‌های پروتئینی بیان شده روی ژل‌های دوبعدی اسکن شده، از نرم‌افزار Melanie 6.2 (Gene Bio, Geneva, Switzerland) استفاده شد. بدین ترتیب که پس از انتخاب لکه‌ها روی ژل‌ها در نرم‌افزار و ویرایش دستی آن‌ها، لکه‌ها به طور اتوماتیک در ژل‌های مختلف با هم جفت شدند. پس از جفت‌نمودن لکه‌های تیمارهای مختلف، به طور دستی بررسی شدند تا از صحت عمل نرم‌افزار در جفت‌نمودن لکه‌ها اطمینان حاصل شود. تفاوت‌های بین لکه‌های دو تیمار متفاوت، شناسایی شدند. درصد حجمی توسط نرم‌افزار محاسبه شد. برای شناسایی لکه‌هایی که بین دو تیمار تفاوت معنی‌دار نشان دادند با استفاده از آزمون آماری t-استیودنت تفاوت بین میانگین‌های درصد حجمی دو تیمار مشخص شد. همچنین، به منظور تعیین میزان کاهش و یا افزایش بیان پروتئین‌ها در شرایط تغذیه و یا عدم تغذیه سرخرطومی، میانگین درصد حجمی هر لکه در مرحله تنش به میانگین درصد حجمی همان لکه در مرحله عدم تنش تقسیم و به عنوان شاخص تغییرات بیان پروتئین<sup>۱</sup>

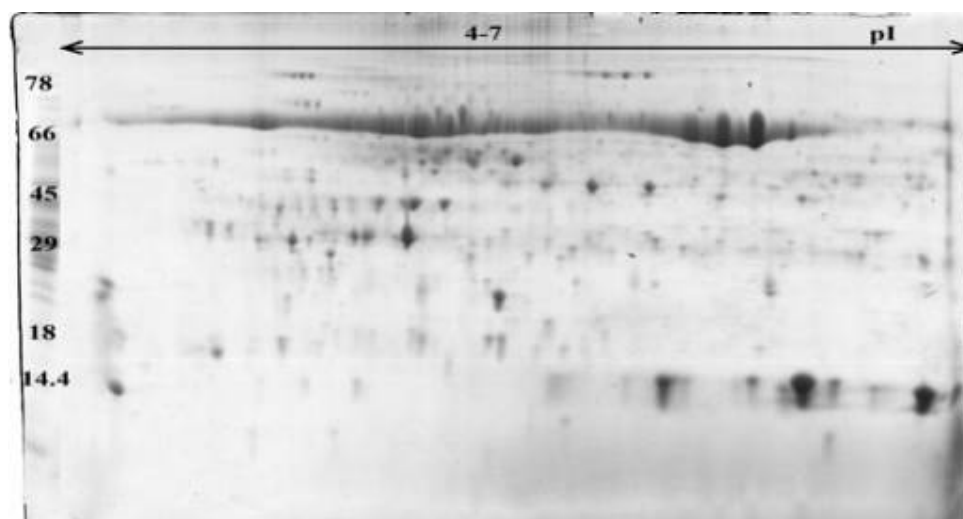
<sup>2</sup>- Amersham Pharmacia Biotech

<sup>1</sup>- Induction factor



شکل ۱- الگوی الکتروفورز دوبعدی مرحله تحت تغذیه ژنوتیپ تفرش ۴۲ یونجه، روی ژل ۱۲/۵ درصد.

Figure 1- Two-dimensional electrophoresis pattern under feeding on genotype Tafresh42, onto the 12/5% gel.



شکل ۲- الگوی الکتروفورز دوبعدی مرحله عدم تغذیه از ژنوتیپ تفرش ۴۲ یونجه، روی ژل ۱۲/۵ درصد.

Figure 2- Two-dimensional electrophoresis pattern of the non-feeding on Tafresh42 genotype, onto the 12/5% gel.

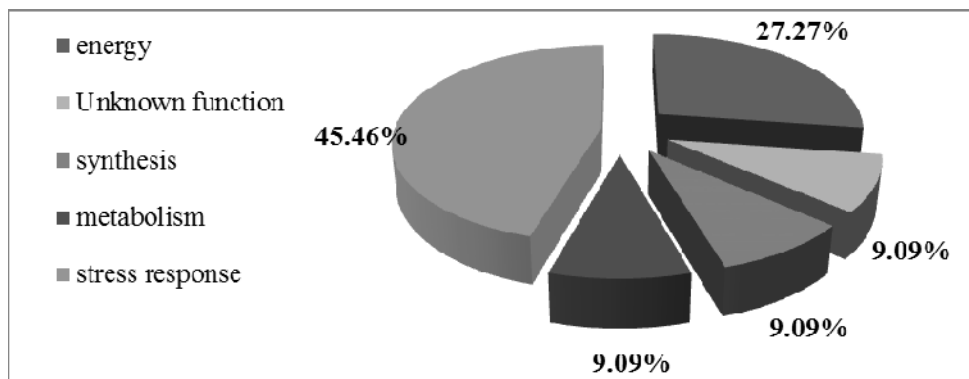
کاربردهای آماری نرم‌افزارهای تجزیه ژل مورد توجه قرار گرفت. بررسی نمودارهای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که ژل‌های مرتبط با تیمارها دارای تکرارپذیری مطلوب بوده و نیز تیمارهای انتخاب شده، دارای تفاوت معنی‌داری از نظر بیان لکه‌ها می‌باشند. شکل ۵ تجزیه خوشه‌ای میانگین حجم لکه‌ها در جمعیت تفرش ۴۲ و در شرایط عدم تغذیه سرخرطومی برگ یونجه را بر اساس روش Ward نشان می‌دهد که خط برش در فاصله ۴، دندروگرام را در دو گروه خوشه‌بندی نموده است.

بدین صورت که لکه‌های شماره ۳۵ و ۸۷ در خوشه اول (با شماره‌های ۳ و ۱۰ در نمودار) و لکه‌های شماره ۲۹، ۳۱، ۴۹، ۵۵، ۶۲، ۶۷، ۶۹، ۷۴ و ۸۹ در خوشه دوم (به شماره ۱، ۷، ۴، ۲، ۱۱، ۵، ۶، ۹ و ۸ در نمودار) قرار گرفتند. در تحقیقی (Zali et al, 2011) نیز در مطالعات الکتروفورز دوبعدی از تجزیه خوشه‌ای استفاده کرده و آن را روشی ارزشمند در مطالعات پروتئومی گزارش و بر اساس آن لکه‌ها را دسته‌بندی نمودند.

هر چقدر نسبت شاخص تغییرات بیان پروتئین بزرگ‌تر از یک باشد، نشان‌دهنده افزایش بیان آن لکه پروتئینی طی مرحله تغذیه سرخرطومی نسبت به عدم تغذیه توسط آن بوده و هرچه این شاخص کوچک‌تر از یک باشد به معنای کاهش بیان لکه مورد نظر است. از بین ۱۱ لکه پروتئینی دارای تغییرات بیانی معنی‌دار (۸ لکه با افزایش بیان و ۳ لکه با کاهش بیان) در ژنوتیپ تفرش ۴۲، بیشترین تعداد آن‌ها یعنی ۴۵/۴۶ درصد در پاسخ به تنش، بیان شده بودند و پس از آن حدود ۲۷/۲۷ درصد از آن‌ها در متابولیسم انرژی نقش ایفا می‌کردند. پروتئین‌های بیان‌شده با عملکرد نامشخص، شرکت‌کننده در متابولیسم و سنتز نیز هرکدام ۹/۰۹ درصد از کل پروتئین‌های بیان شده را به خود اختصاص دادند (شکل ۳). مطالعه سازوکارهای مقاومت به تنش به کمک تلفیق روش‌های متنوع ژنومیکس کاربردی نظیر ترانس‌کریپتومیکس و پروتئومیکس با مطالعه تنش‌ها و همچنین بیوشیمی متابولیت‌ها امکان‌پذیر خواهد بود و بدین ترتیب فرآیند پیچیده نحوه‌ی مقابله گیاهان با تنش‌ها مشخص خواهد شد (Salkdeh and Nasrabadi, 2010). شکل ۴ تصویر دو و سه‌بعدی لکه‌های پروتئینی با بیان معنی‌دار در ژنوتیپ تفرش ۴۲ را نشان می‌دهد.

در آنالیز داده‌های مهم پروتئومیکی با دارا بودن متغیرهای زیاد نیاز به روش‌های چندمتغیره است تا امکان تجزیه آماری همزمان چندین متغیر فراهم شود (Zali et al., 2011). در این مطالعه،



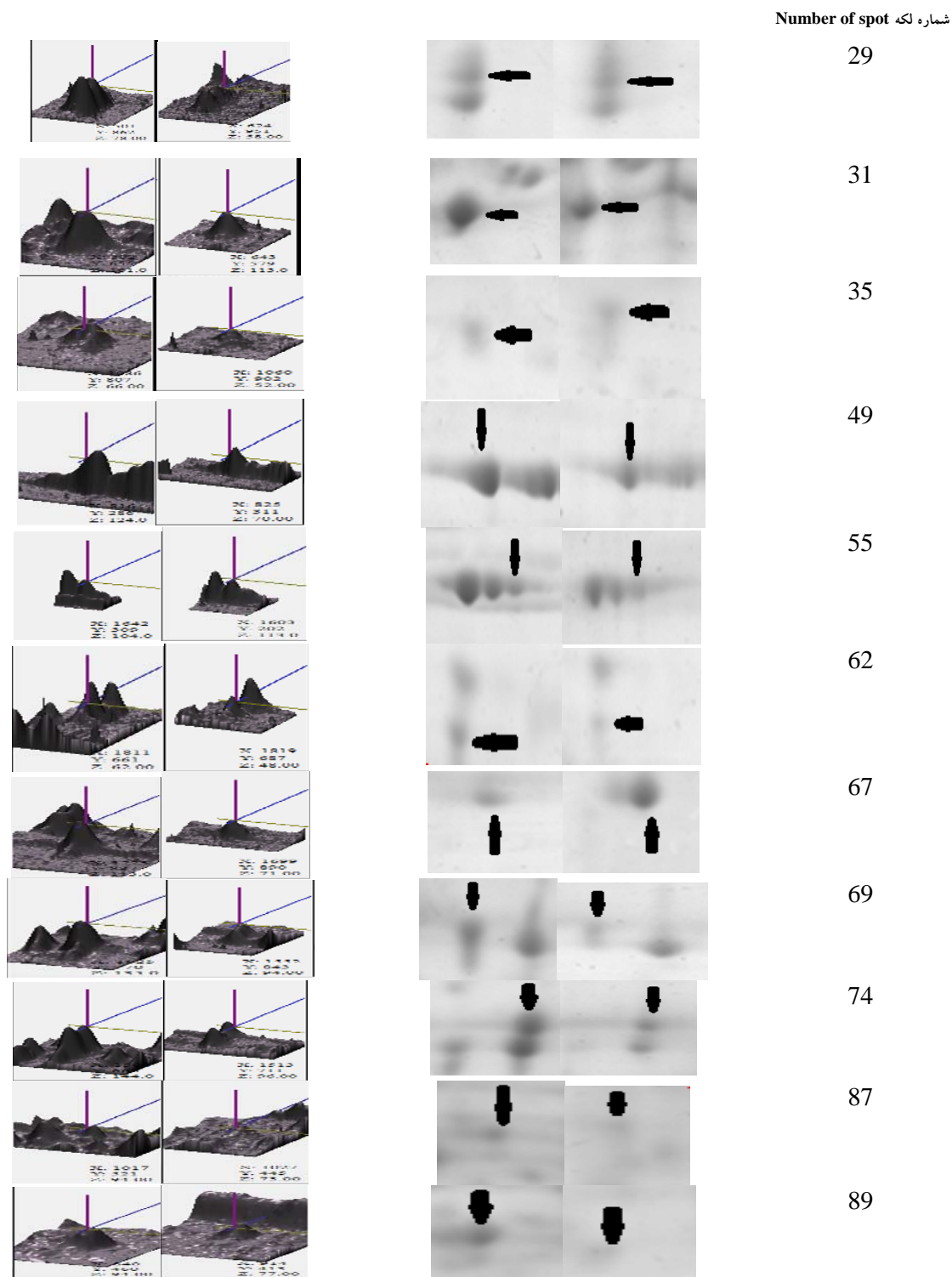


شکل ۳- نمودار درصد لکه‌های پروتئینی با تغییرات بیانی معنی‌دار در ژنوتیپ تفرش ۴۲ (براساس عملکرد و نقش آن‌ها).

**Figure 3- Diagram of a protein spots with significant changes in Tafresh42 genotype (On the base of performance and their functions).**

در یک گروه قرار دارند. این موضوع نشان می‌دهد که لکه‌هایی در نزدیک هم قرار دارند هم‌خانواده بوده و یا از عملکرد مشابهی برخوردارند. (Castiljo *et al* (2011) در گیاه نخود علوفه‌ای، در مطالعه الکتروفورز دو بعدی با کمک روش‌های آماری چندمتغیره نظیر تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، ۴۳ لکه پروتئینی مختلف تحت شرایط آزمایشگاهی شناسایی کرده و استفاده از روش‌های آماری چندمتغیره را در تجزیه و تحلیل لکه‌های پروتئینی مطلوب گزارش نمودند.

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از ژل‌های دوبعدی با کمک روش‌های آماری چندمتغیره نتایج گروه‌بندی بر اساس نقاط پروتئینی در ژنوتیپ تفرش ۴۲ در شرایط عدم تغذیه مورد تأیید تجزیه تابع تشخیص می‌باشد. شکل ۶ بای‌پلات مربوط به پراکنش حجم لکه‌ها در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در جمعیت تفرش ۴۲ در شرایط عدم تغذیه سرخرطومی را نشان می‌دهد. با توجه به شکل بای‌پلات، لکه‌هایی که نزدیک به هم قرار دارند، از نظر تجزیه خوشه‌ای



شکل ۴- تصویر دو و سه بعدی لکه های پروتئینی با بیان معنی دار در ژنوتیپ تفرش ۴۲.

Figure 4- three-dimensional image of two protein spots with significant expression in Tafresh 42 genotype.

جدول ۳- ویژگی لکه‌های پروتئینی دارای تغییر بیانی معنی‌دار بین مرحله عدم تغذیه و مرحله تحت تغذیه سرخرطومی در یونجه مورد مطالعه.

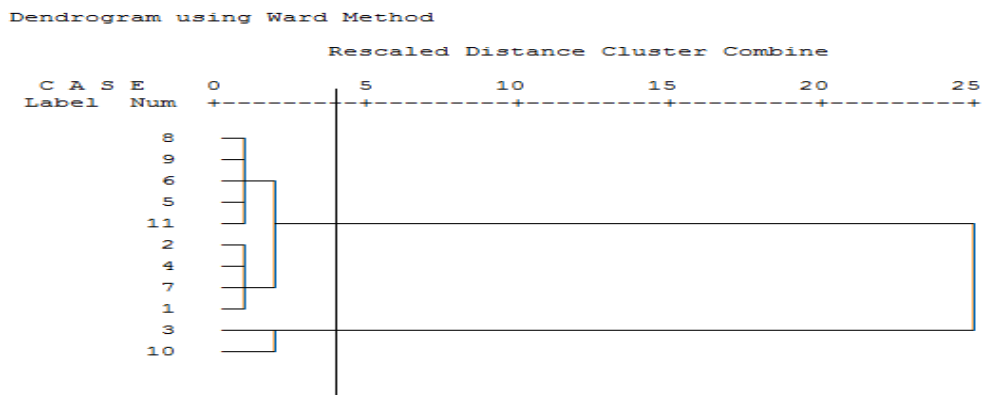
**Table 3- Features of protein spots with different significant detections between the feeding and non-feeding conditions in alfalfa under study.**

Number (Landmark)	Match ID	میانگین درصد حجم برای هر لکه پروتئینی در مرحله عدم تغذیه		T-test	Fold change (IF)	نوع بیان Expression type
		میانگین درصد حجم برای هر لکه پروتئینی در مرحله تغذیه	میانگین درصد حجم برای هر لکه پروتئینی در مرحله عدم تغذیه			
		Average volume percent of spots in feeding conditions ± standard error	Average volume percent of spots in non- feeding conditions ± standard error			
29	894	0.24346±0.01	0.37496±0.008	0.002	0.6492	کاهش
31	805	0.45669±0.04	0.2235±0.003	0.007	2.0433	افزایش
35	866	0.18007±0.01	0.9455±0.01	0.011	0.1904	کاهش
49	655	0.44024±0.05	0.23251±0.01	0.022	1.8934	افزایش
55	658	0.18267±0.02	0.06335±0.01	0.007	2.8835	افزایش
62	800	0.4592±0.004	0.10230±0.01	0.018	4.4887	افزایش
67	852	0.25241±0.01	0.17231±0.01	0.037	1.4648	افزایش
69	850	0.27717±0.03	0.13038±0.02	0.020	2.1258	افزایش
74	810	0.29796±0.03	0.12664±0.02	0.012	2.3528	افزایش
87	745	0.17580±0.02	0.6846±0.01	0.027	0.2567	کاهش
89	729	0.14902±0.02	0.05218±0.01	0.047	2.8558	افزایش

جدول ۴- مشخصات پروتئین‌های بیان شده در ژنوتیپ تفرش ۴۲ بر اساس گزارشات موجود.

**Table 4- Profile proteins expressed in Tafresh 42 genotype based on present reports.**

Landmark	Name	pI	MW(kDa)	Organism	Function	Reference
29	sedoheptulose-1,7-bisphosphatase precursor	4.20	30.5	<i>Oryza sativa</i>	Energy	Aranjuelo <i>et al.</i> , 2011
31	Putative calreticulin precursor	4.47	48.45	<i>O. sativa</i>	Stress	Hashimoto and Komatsu, 2007
35	Phosphoribulokinase	5.41	39.23	<i>Pisum sativum</i>	Energy	C. Xu <i>et al.</i> , 2006
49	Heat Shock protein HSP 70	5.22	75.40	<i>Medicago sativa</i>	Stress	Chen <i>et al.</i> , 2009
55	Putative phenylalanine ammonia lyase	6.07	76.02	<i>O. sativa</i>	Stress	Hashimoto and Komatsu, 2007
62	Chalcone synthase(CHS)	6.18	43.16	<i>Vitis vinifera</i>		Di Carli <i>et al.</i> , 2011
67	Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase	6.62	34.73	<i>V. vinifera</i>	Stress Energy and Carbon Metabolism	Di Carli <i>et al.</i> , 2011
69	DegP1	6.2	36.5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Unknown Function	Peltier <i>et al.</i> , 2002
74	Chalcone synthase(CHS)	6.18	43.16	<i>V. vinifera</i>	Stress	Di Carli <i>et al.</i> , 2011
87	ATP synthase beta subunit	5.62	51	<i>M. sativa</i>	Synthetic	Chen <i>et al.</i> , 2009
89	UDP-glucose pyrophosphorylase	5.21	51.31	<i>O. sativa</i>	Metabolism	Hashimoto and Komatsu, 2007



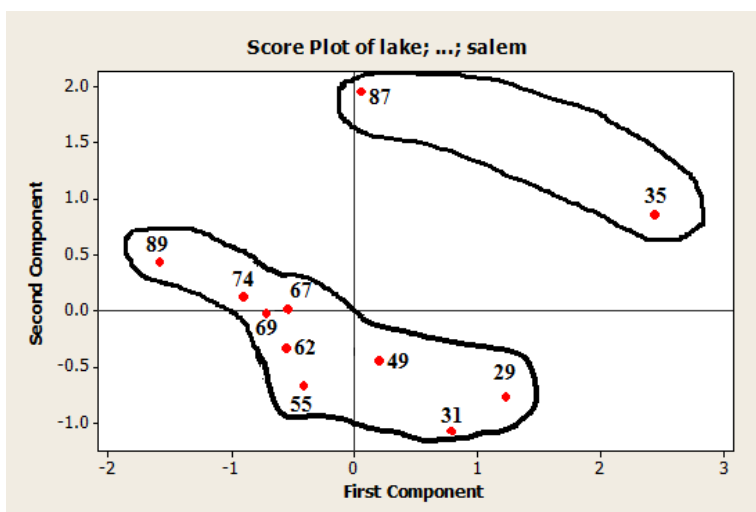
شکل ۵- تجزیه خوشه‌ای میانگین حجم لکه‌ها در ژنوتیپ تفرش ۴۲ در شرایط عدم تغذیه سرخرطومی بر اساس روش وارد (۱۹۶۳).

Figure 5- Cluster analysis of the average volume of spots in Tafresh42 genotype in non-feeding weevil condition based on input Ward method (1963).

جدول ۵- نتایج تجزیه تابع تشخیص گروه‌بندی بر اساس نقاط پروتئینی ژنوتیپ تفرش ۴۲ در شرایط عدم تغذیه سرخرطومی.

Table 5- Result of discrimination analysis for classification based on Tafresh 42 genotype protein spots in feeding weevil condition.

Total مجموع	Predicted Group Membership گروه‌های پیش‌بینی شده بر اساس تجزیه تابع تشخیص						Groups based on cluster analysis گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای	
	3		2		1			
%. تعداد درصد	Number تعداد	%. تعداد درصد	Number تعداد	%. تعداد درصد	Number تعداد	%. تعداد درصد	Number تعداد	
100	2	0	0	0	0	100	2	1
100	9	0	0	100	9	0	0	2

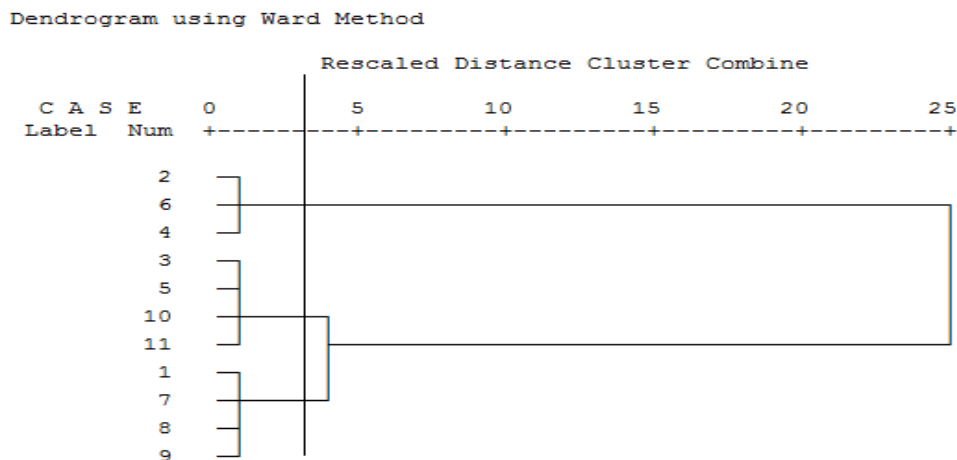


شکل ۶- بای پلات مربوط به پراکنش حجم لکه‌ها در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ژنوتیپ تفرش ۴۲ در شرایط عدم تغذیه سرخرطومی.

**Figure 6- Biplot related to the distribution of Tafresh 42 genotype spots on principal component analysis in non-feeding weevil condition.**

بطور ۱۰۰ درصد مورد تأیید تابع تشخیص می‌باشد. شکل ۸ بای پلات مربوط به پراکنش حجم لکه‌ها با روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در ژنوتیپ تفرش ۴۲ و در شرایط تغذیه سرخرطومی را نشان می‌دهد که بر اساس آن ژنوتیپ‌هایی که نزدیک به هم هستند و در یک خط بسته قرار گرفته‌اند، از نظر تجزیه خوشه‌ای در یک گروه قرار گرفته‌اند. در گیاه گندم (Janmohamdi 2009) نیز از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به نحو مطلوبی استفاده کرده و آن را روشی توانا و مناسب در گروه‌بندی تیمارهای مورد مطالعه دانسته‌اند.

شکل ۷ تجزیه خوشه‌ای بر اساس میانگین حجم لکه‌ها در ژنوتیپ تفرش ۴۲ و در شرایط تغذیه سرخرطومی بر اساس روش Ward را نشان می‌دهد. خط برش در فاصله ۴، لکه‌های پروتئینی با تغییرات بیانی معنی‌دار را در سه گروه خوشه‌بندی کرده است. بر این اساس، لکه‌های شماره ۳۱، ۴۹ و ۶۲ در خوشه اول (به ترتیب با شماره‌های ۲، ۴ و ۶ در نمودار)، لکه‌های شماره ۲۹، ۶۷، ۶۹ و ۷۴ (به ترتیب با شماره‌های ۳، ۵، ۱۰ و ۱۱ در نمودار) در خوشه دوم و لکه‌های شماره ۳۵، ۵۵، ۸۷ و ۸۹ (به ترتیب با شماره‌های ۱، ۷، ۸ و ۹) در خوشه سوم قرار گرفتند. جدول ۶ نتایج تابع تشخیص برای گروه‌بندی بر اساس نقاط پروتئینی در ژنوتیپ تفرش ۴۲ در شرایط تغذیه سرخرطومی را نشان می‌دهد و این نتایج



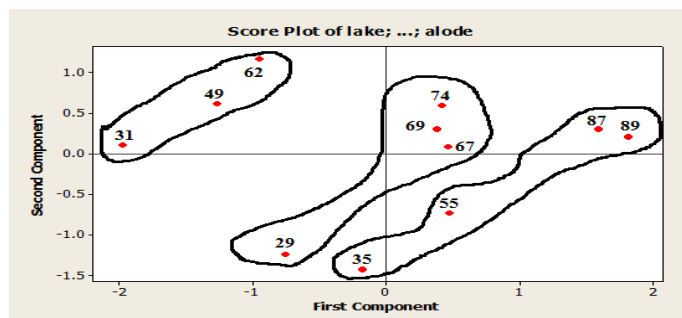
شکل ۷- تجزیه خوشه‌ای میانگین حجم لکه‌ها در ژنوتیپ تفرش ۴۲ و شرایط تغذیه سرخرطومی بر اساس روش وارد (۱۹۶۳).

Figure 7- Cluster analysis Average volume Tafresh 42 Genotype spots in the alfalfa weevil feeding conditions based on input Ward method (1963).

جدول ۶- نتایج تابع تشخیص گروه‌بندی بر اساس نقاط پروتئینی ژنوتیپ تفرش ۴۲ در شرایط تغذیه سرخرطومی.

Table 6- Result of discrimination analysis for Classification based on the protein detection function Alfalfa Weevils Tafresh 42 genotype in the alfalfa weevil feeding condition.

Total کل	Predicted Group Membership						Groups based on cluster analysis گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای	
	گروه‌های پیش‌بینی شده بر اساس تجزیه تابع تشخیص							
	3		2		1			
Number	Number	Number	Number	Number	Number	Number		
٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪		
تعداد	تعداد	تعداد	تعداد	تعداد	تعداد	تعداد	تعداد	
درصد	درصد	درصد	درصد	درصد	درصد	درصد	درصد	
100	4	0	0	0	0	100	3	1
100	4	0	0	100	4	0	0	2
100	4	100	4	0	0	0	0	3



شکل ۸- بای پلات مربوط به پراکنش حجم لکه‌ها در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ژنوتیپ تفرش ۴۲ و شرایط تغذیه سرخرطومی.

**Figure 8- Biplot related to the distribution of Tafresh 42 genotype spots on principal component analysis and in alfalfa Weevils feeding condition.**

### نتیجه‌گیری کلی

تنهایی راهگشا نخواهد بود بلکه، شناخت مجموعه پروتئین‌های هم بیان و مطالعه الگوی تغییرات جمعی آن‌ها در پاسخ به سطوح مختلف تنش مهم است و درک مطلوب‌تری می‌دهد. در بین پروتئین‌های شناسایی شده احتمالی، بیشترین تعداد آن‌ها یعنی ۴۵/۴۶ درصد در پاسخ به تنش، بیان شده بودند و پس از آن حدود ۲۷/۲۷ درصد از آن‌ها در متابولیسم انرژی نقش ایفا کردند و در واقع، این نوع پروتئین‌ها، انرژی مورد نیاز برای واکنش‌های دفاعی در برابر تنش را تأمین می‌کنند و پروتئین‌های بیان‌شده با عملکرد نامشخص، شرکت‌کننده در متابولیسم و سنتز نیز هرکدام ۹/۰۹ درصد از کل پروتئین‌های بیان شده را به خود اختصاص دادند. در واقع می‌توان پیشنهاد نمود که، اگر توالی پروتئین‌هایی که در شرایط تنش آفت سرخرطومی، بیان شده بودند مشخص و تعیین گردد، امکان حصول به نتایج مطمئن‌تری جهت اهداف مهندسی ژنتیک فراهم خواهد شد.

برای فهم بهتر و عمیق‌تر کنترل آفت سرخرطومی برگ یونجه، اثر متقابل و ارتباط بین سازوکارهای سطوح ملکولی ضروری و مورد نیاز است. اخیراً تجزیه پروتئومیکی به یک ابزار مطلوب در تحقیق فرآیندهای پیچیده سلولی نقش ایفا می‌کند. این روش در بررسی‌های ژنتیکی و شناسایی احتمالی پروتئین‌های گیاهی دخیل در تحمل و مقاومت به آفات بسیار موفق بوده است. یکی از موارد اساسی در شناخت سازوکار تحمل و مقاومت گیاهان در پاسخ به تنش‌ها، بررسی و شناسایی تغییرات در سطوح پروتئین‌های درگیر در این فرآیند می‌باشد (Aflatoni, 2010). در این پژوهش، بررسی نمودارهای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که ژل‌های مرتبط با تیمارها دارای تکرارپذیری مطلوب بوده و نیز تیمارهای انتخاب شده، دارای تفاوت معنی‌داری از نظر بیان لکه‌ها می‌باشند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که مطالعه میزان تغییرات بیان پروتئین‌های منفرد به



- Aflatoni, MM (2010). Technique and Interpretation of the Electrophoretic Types. Tehran University press.
- Castillejo M, Fernandez-Aparicio M, Rubiales D (2011). Proteomic analysis by two-dimensional differential in gel electrophoresis (2D DIGE) of the early response of *Pisum sativum* to *Orobanche crenata*. Journal of Experimental Botany 63: 1–13.
- Damerval C, de Vienne D, Zivy M, Thiellement H (1986). The technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. Electrophoresis 7: 52-54.
- Danilson S (1989). The Alfalfa weevil, Neguide, G73-30-Adiversity among Argentine grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using morphological data and AFLP markers. Journal of Biotechnology 6: 241-250.
- Gygi SP, Rist B, Aebersold R (2000). Measuring Gene Expression by Quantitative Proteome Analysis. Current Opinion in Biotechnology 11: 396-401.
- Janmohamadi M (2009). Study of Changes of Cold-Induced Proteins during Transition of Vegetative to Reproductive Stages in Winter Wheat under Field Conditions. Crop Physiology PhD thesis. College of Agriculture and Natural Resources of Tehran University.
- Karimi H (1989). Agriculture of plant. Tehran Press. No. 387 (In Farsi).
- Khezri A (2013). Molecular and chemical analysis of the protein subunits and fractions of sesame meal in comparison to cottonseed meal and soybean meal using SDS-Page electrophoresis and CNCPS methods. Journal of Agricultural Biotechnology 5: 71-81.
- Mazahery-Laghah H (2003). Study of the resistance of alfalfa cultivars (*Medicago sativa*) to alfalfa weevil (*Hypera postica* Gyll.) attack under water stress conditions. Pajouhesh & Sazandegi 64: 8-15.
- Mohammadi SA, Prasanna BM (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants: Salient statistical tools and considerations. Crop Science 43: 1235–1248.
- Pedreschi R, Hertog ML, Carpentier SC (2008). Treatment of missing values for multivariate statistical analysis of gel-based proteomics data. Proteomics 8: 1371-1383.
- Raesi sadati SE, Gadeh Kahriz SJ, Ebadi A (2016). Expression of proteins in the leaves of two wheat cultivars under stress induced by cadmium and mercury using two-dimensional electrophoresis. Journal of Crop Production and Processing 5: 233-243.
- Salekdeh GH, Nasrabadi D (2010). Proteomic Analysis of Root and Leaf in Rice under Salinity Stress. Crop Biotechnology 1: 1-11.
- Sayari M, Babaeizad V, Tajick-Ghanbari MA, Rahimian H (2015) Resistance of Two Rice Cultivars to the Sheath Blight Agent *Rhizoctonia solani* AG1-1A. Journal of Agricultural Biotechnology 7: 97-112.
- Zali H, Rezaei Tavirani M, Sayedkhani Nahal A, Shahriari Noor M, Ilghari N (2011). Data Analysis of Two Dimensional Electrophoresis Gels by Multivariate Statistical Methods. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences 20: 219-231.

**Study of protein changes in alfalfa (*Medicago sativa* L.) in normal conditions and under the tension from alfalfa weevil (*Hypera postica* Gyll.) feeding**

**Kakaei M.<sup>1</sup>, Mazahery-Laghab H.\*<sup>2</sup>, Mostafaei A.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Former Ph.D Candidate, Plant Breeding (Molecular Genetics), Department of Agronomy and Plant Breeding Faculty of Agriculture, Bu- Ali Sina University, Hamedan, Iran.

<sup>2</sup>Associate Professor of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan-Iran.

<sup>3</sup>Medical Biology Research Center, University of Medical Sciences, Kermanshah.

**Abstract**

The use of resistant cultivars is one of the safest and most profitable methods of controlling post including alfalfa weevil. After farm and greenhouse evaluating, Tafresh 42 genotype for molecular studies selected and evaluated to examine the pattern of protein expression in stress and non-stress conditions to alfalfa weevil. The Changes in protein expression were investigated using two-dimensional electrophoresis gels. Clustering analysis, principal component analysis and discriminant analysis were used in statistic studies. The results showed that 11 protein spots had expression changes among 218 protein spots. The most expression pattern of proteins with a similar increase in Tafresh 42, was related to a specific group of proteins which had 45.46% variations in the expression response to the stress. From the point of protein expression, cluster analysis caused a dividing of proteins into three main clusters indicating the presence of proteins with a similar performance in each cluster. Therefore, the presence of these proteins in a common biologic pathway is confirmed. The analysis of discriminant function confirmed 100% the results from clustering that indicated protein conformity with the conditions of the experiment. It is concluded that by using statistical analysis and software, it is possible to evaluate significant expression changes induced damage alfalfa weevil in proteome level and determine the index changes, and after that genetic engineering is utilized for enhancing the level of resistance in the plant under studying.

**Keywords:** *Alfalfa Weevil, cluster analysis, Two-dimensional electrophoresis, Protein expression.*

---

\* Corresponding Author: Hojatollah Mazahery-Laghab Tel:09183122167 Email:hojat.mazahery@yahoo.co.uk  
Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500