

بررسی الگوی پروتئومی جو بهاره (*Hordeum vulgare*) تحت تنش

سرماي کوتاه مدت

The Proteomic Analysis of Spring Barley Leaves under Short term Cold Stress

رعنا ولی زاده کامران^{۱,۲}، محمود تورچی^{۱*}، محمد مقدم^۱ و حمید محمدی^۳

Rana valizadeh kamran^{1,2}, Mahmood Toorchi^{1*}, Mohammad Moghaddam¹,
Hamid Mohammadi³

۱- گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- گروه بیوتکنولوژی، ۳- گروه زراعت، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
کیلومتر ۳۵ جاده تبریز مراغه

1. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture,
University of Tabriz, Tabriz, Iran

2. Department of Biotechnology and 3. Department of Agronomy - Faculty of
Agriculture Azarbaijan Shahid Madani University, km35 Tabriz-Maragheh Road

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mtoorchi@tabrizu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۳۱)

چکیده

سرما یکی از مهمترین تنش‌های غیر زیستی است که باعث ایجاد محدودیت در رشد گیاهان و کاهش تولید محصول در مناطق سردسیر و معتدل می‌شود. برای درک مکانیسم مولکولی سازش گیاهچه‌های جو بهاره با سرماي کوتاه مدت، تغییرات پروتئومی برگ جو مورد مطالعه قرار گرفت. به این منظور سرماي ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت بر روی گیاهچه‌های جو رقم *Aths* اعمال گردید. سپس برگهای سوم برداشت شده و با گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط نرمال ۲۵ درجه سانتی‌گراد مقایسه شدند. تجزیه پروتئوم توسط الکتروفورز دو بعدی و رنگ آمیزی آبی کوماسی انجام شد. ۱۵ لکه پروتئینی تکرارپذیر دارای اختلاف معنی دار از نظر بیان بین شرایط تنش و کنترل شناسایی شدند که ۱۰ لکه افزایش بیان و ۵ لکه کاهش بیان در تنش سرماي چهار درجه را نشان دادند. با استفاده از طیف سنجی جرمی MALDI-TOF ۷ لکه پروتئینی شناسایی شدند که این پروتئین‌ها در مسیرهای چرخه کالوین، انتقال الکترون، واکنش نوری و ترانسانی علامت درگیر بودند. افزایش بیان در پروتئین‌هایی مشاهده گردید که در یکپارچگی کلروپلاست، متابولیسم انرژی، دفاع آنتی‌اکسیدانی و فتوسنتز دخالت داشتند. این بررسی نشان داد که تنش سرما در جو بهاره فتوسنتز را بیشتر تحت تاثیر قرار می‌دهد.

واژه‌های کلیدی

جو
پروتئوم
سرما
الکتروفورز دو بعدی
MALDI-TOF

مقدمه

تنش سرما تاثیر شدیدی بر رشد و نمو و بقای گیاهان دارد (Xu et al. 2008). عدم تحمل به سرما یکی از عوامل اصلی کاهش تولید محصول می باشد. گیاهان وقتی در معرض دماهای پائین قرار می گیرند برای تطبیق خود با تنش و افزایش تحمل به سرما بسیاری از تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را در خود ایجاد می نمایند (Gomat et al. 2011). گیاه جو در انواع بهاره و زمستانه وجود دارد. برای جلوگیری از تنش گرما و خشکی آخر فصل، لازم است که ارقام بهاره زودتر کشت شوند (Gusta and Fowler, 1977). بنابراین احتمال اینکه تیپ بهاره مورد تنش سرمای بهاره قرار گیرد وجود دارد. سرمای بهاره در اواخر مراحل رویشی و شروع مرحله زایشی به غلات آسیب می رساند و عملکرد آنها را حدود ۳۰ تا ۵۰ درصد کاهش می دهد (Shroyer et al. 1995; Zhong et al. 2008). برنامه های اصلاحی نسبت به عادت دهی به سرما و انجماد زمستانی، کمتر مورد بررسی قرار گرفته شده است (Galiba et al. 2009). تنش سرما باعث ایجاد طیف گسترده ای از پاسخ های فیزیو-بیوشیمیایی و تغییرات بیان ژن در گیاهان می شود (Chinnusamy et al. 2007; Heidarvand and Maali Amiri, 2010) که باعث تحمل گیاه به تنش سرما می شوند. پروتئین ها نقش بسیار مهمی را در پاسخ گیاهان به تنش ایفا می کنند چرا که در تغییرات ساختاری و هم تغییرات متابولیکی گیاه نقش دارند. پروتئین ها در تنش سرمای گندم و جو در قسمت های سوخت و ساز انرژی، فنوستت، مهار گونه های فعال اکسیژن، تنظیم چرخه سلولی، رشد گیاه و حفاظت در برابر تنش درگیر هستند (Kosová et al. 2014). مطالعات پروتئومی باعث شناسایی پروتئین های جدید درگیر در پاسخ به تنش سرما در گیاهان شده اند که در غلات نیز چندین مطالعه تجزیه پروتئوم پاسخ به تنش سرما انجام گرفته است (Vitamvase et al. 2007; Sarhadi et al. 2010; Rinalducci et al. 2011; Vitamvase et al. 2012; Xu et al. 2013; Kosova et al. 2013; Gharechahi et al. 2014). علیرغم تلاش های زیاد در مورد درک پروتئین های پاسخگو به سرما اطلاعات محدودی در مورد پاسخ پروتئومی جو وجود دارد. بنابراین لازم است تجزیه پروتئوم جو در پاسخ به تنش سرما مورد

تجزیه و تحلیل قرار گیرد تا اطلاعات مفیدی از درک مکانیسم مولکولی سرما در این گیاه به دست آید. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر تنش سرمای کوتاه مدت بر الگوی پروتئینی برگ جو بهاره و شناسایی پروتئین های پاسخ دهنده به تنش با استفاده از راهکار پروتئومیکس می باشد. استفاده از این اطلاعات در کنار سایر تکنیک های مولکولی ضمن شناسایی دقیق تر اثرات تنش سرما بر گیاه و مکانیسم مولکولی مقاومت به تنش سرما، می تواند بستر مناسبی را جهت بهبود صفت تحمل به سرما را در جو و گیاهان مشابه فراهم آورد.

مواد و روش ها

شرایط گیاه و نحوه اعمال سرما

بذور جو بهاره Aths از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه و در ۳ تکرار به صورت طرح کاملاً تصادفی کشت شدند. بذور در مخلوط پرلیت و ماسه به نسبت ۵ به ۲ در گلدان کاشته شد. گلدان ها در گلخانه با دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد، رطوبت ۷۰٪ و طول روز ۱۶ ساعت قرار گرفتند و تا زمان رسیدن به مرحله سه برگه هر روز آبیاری شدند. زمانی که گیاهان به مرحله سه برگه رسیدند، تنش سرمای ۴ درجه سانتی گراد در یخچال قابل برنامه ریزی سرما روی تعدادی از گلدان ها به صورت تصادفی به مدت ۴۸ ساعت اعمال گردید و با گیاهان رشد داده شده در شرایط دمایی طبیعی گلخانه از نظر الگوی پروتئوم مورد مقایسه قرار گرفتند. با توجه به اینکه گیاهان تحت تنش سرما در یخچال در تاریکی قرار می گرفتند گیاهان شاهد هم به مدت دو روز در تاریکی قرار گرفتند.

استخراج پروتئین

نیم گرم از بافت برگ در ازت مایع خرد شد و سپس در محلولی که شامل ۵ میلی لیتر (۱۰۰٪) TCA، ۴۵ میلی لیتر استون سرد و ۷۰ میکرولیتر ۲-مرکاپتواتانول بود، هموژنیزه گردید. عصاره پروتئینی توسط سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۹۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه رسوب داده شد. بر روی رسوب به دست آمده بافر لیز (اوره، تیو اوره، چپس، آمفولین ۱۰-۳ pH) اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه ورتکس گردید. سپس سانتریفیوژ در

دانسئومتر GS800 ساخت شرکت Bio-Rad تصویربرداری شدند و سپس توسط نرم افزار PDQuest مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و لکه های دارای تغییر بیان معنی دار از ژلها جدا شدند.

شناسایی پروتئین ها از طریق روش طیف سنجی جرمی و جستجو در بانکهای اطلاعاتی

به منظور شناسایی پروتئین از انگشت نگاری جرم پپتید استفاده گردید که برای این منظور از روش MALDI-TOF در استفاده شد. شناسایی پروتئینها در مرکز ژنومیکس و پروتئومیکس دانشگاه Tucsia ایتالیا انجام گردید.

نتایج و بحث

بعد از کمی کردن لکهها توسط نرم افزار و انجام آزمون t مجزا برای لکههای پروتئینی، تعداد ۷۲ لکه پروتئینی تکرارپذیر دارای تفاوت معنی دار بین دو شرایط شاهد و تنش سرمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت، شناسایی شد از ۱۵ لکه پروتئینی، ده لکه پروتئینی ۱۸۰، ۱۰۶۶، ۲۱۱۵، ۲۱۷۳، ۲۲۱۵، ۲۳۳۵، ۲۳۶۲، ۲۹۰۶، ۳۲۴۸، ۳۲۶۲ افزایش بیان و پنج لکه ۶۸۰، ۲۴۴۷، ۲۸۸۹، ۲۹۹۹ و ۳۷۷۰ کاهش بیان نشان دادند. از این تعداد با استفاده از روش MALDI-TOF، خصوصیات و نقش هفت پروتئین درگیر در تنش سرما مشخص شد و مشخصات این پروتئینها در جدول شماره ۱ آورده شده است. پروتئینهای دارای تغییر بیان معنی دار در چهار گروه عملکردی قرار گرفتند (شکل ۱). پروتئینهای مرتبط با چرخه کالوین، انتقال الکترون، واکنش نوری فتوسنتز هر کدام ۲۸/۵٪ و پروتئینهای دخیل در ترانسانی پیام ۱۴/۲۵٪ از پروتئینها را به خود اختصاص دادند. لکههای پروتئینی دارای تغییر بیان در شکل ۲ نشان داده شده است.

پروتئینهای دخیل در واکنش نوری فتوسنتز

لکه های پروتئین ۲۱۱۵ و ۳۷۷۰ در این گروه قرار گرفتند. لکه شماره ۲۱۱۵ پروتئین متصل شونده به ساخنا ساقه حلقه کلروپلاستی یا Chloroplast stem-loop binding protein of 41b (CSP41b) می باشد که افزایش بیان نشان داده است.

دمای ۲۵°C با دور ۲۰۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد و محلول روئی جمع آوری و به فریزر ۸۰- منتقل گردید.

تعیین غلظت پروتئینها

برای اندازه گیری میزان غلظت پروتئینها از روش برادفورد استفاده شد. ابتدا دستگاه اسپکتروفومتر با محلول BSA کالیبره و منحنی استاندارد رسم گردید، سپس میزان جذب نمونهها در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت گردید.

الکتروفورز دو بعدی

الکتروفورز بعد اول

در بعد اول الکتروفورز پروتئینها بر حسب بار الکتریکی در یک میدان الکتریکی از یکدیگر تفکیک شدند که در این تحقیق از تیوب ژلهایی با طول ۱۱ سانتی متر و قطر ۳ میلی متر استفاده شد (O'Farrell, 1975). برای تهیه ژل بعد اول از اوره، پلی آکرلامید ۳۰٪، NP-40، آمفولینهای با pH(۳-۱۰) و pH(۵-۸) APS و TEMED استفاده شد. الکتروفورز بعد اول طی سه مرحله به ترتیب ۲۰۰ ولت به مدت نیم ساعت، ۴۰۰ ولت به مدت ۱۶ ساعت و ۶۰۰ ولت به مدت یک ساعت اجرا گردید.

الکتروفورز بعد دوم (SDS-PAGE)

در الکتروفورز بعد دوم پروتئینها بر اساس وزن مولکولی از یکدیگر جدا می شوند. ژل بعد دوم به صورت دو قسمتی شامل ژل جدا کننده و ژل نگهدارنده تهیه گردید. قبل از انجام بعد دوم نوار ژلها به مدت ۱۵ دقیقه در SDS sample buffer شناور گردیدند سپس نوار ژل بر روی ژل آکرلامید قرار گرفت و با محلول ژل آگارز ۰/۵ درصد پوشانده شد. به ازای هر ژل ۲۰۰ میکرولیتر (برای دو ژل ۴۰۰ میکرولیتر) نشانگر آبی بروموفنول بلو داخل بافر ریخته شد تا میزان حرکت اولین (سبکترین) لکه پروتئینی به انتهای ژل کنترل شود و عملیات توقف گردد. سپس عملیات رانش با جریان ثابت ۳۵ میلی آمپر برای هر ژل و مدت زمان ۳-۲/۵ ساعت تا رسیدن نشانگر آبی به انتهای ژل جداکننده برقرار گردید.

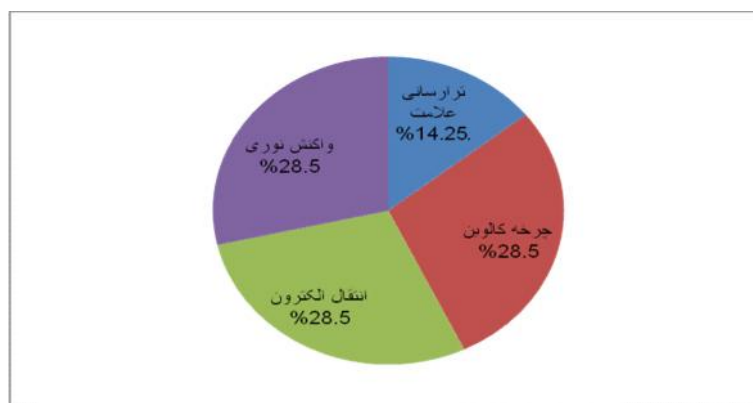
رنگ آمیزی و تصویر برداری

بعد از اتمام الکتروفورز بعد دوم، ژلها توسط محلول رنگ آمیزی آبی کوماسی رنگ آمیزی شدند. ژلها توسط دستگاه

جدول ۱- اسامی و خصوصیات پروتئین های پاسخ دهنده به تنش سرما در رقم Aths

Table 1: Cold responsive proteins of Aths leaves (susceptible barley) during short- term cold stress with LC – MS/MS

گروه عملکردی	شماره لکه	Score	نام پروتئین	طبقه بندی	Accession No	Theoretical MW (kDa)	Theoretical pI	Experimental MW (kDa)	Experimental pI
انتقال الکترون	۲۱۷۳	۱۶۷	ATPase beta subunit chloroplast	Hordeum vulgare	gi 11583	۵۳.۸۹۹	۵.۱۱	۱۱۴.۱	۵.۶
	۳۲۴۸	۵۶	Mitochondrial thioredoxin	Hevea brasiliensis	gi 329750617	۲۰.۳۴۱	۹.۴۱	۲۷.۲	۴.۴
چرخه کالوین	۱۸۰	۷۹	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	Pentas lanceolata	gi 294117	۵۳.۴۷۸	۶.۱۳	۸۷.۲	۶.۲۴
	۲۳۶۲	۵۴	Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase activase isoform 1	Hordeum vulgare	gi 167096	۴۷.۳۴۱	۸.۶۲	۴۳.۲	۵.۴۸
واکنش نوری	۲۱۱۵	۸۳	chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa b, chloroplastic-like	Oryza brachyantha	gi 573963758	۴۱.۶۳۶	۸.۳۱	۳۸.۳	۷.۴
	۳۷۷۰	۵۳	Photosystem I reaction Ncenter subunit IV	Hordeum vulgare	gi 131176	۱۵.۴۴۷	۹.۸۲	۲۲.۱	۹.۷۰
ترارسانی علامت	۲۴۴۷	۳۰۸	protein homologue ۳-۳-۱۴	Hordeum vulgare subsp. vulgare	gi 22607	۲۹.۳۶۱	۴.۸۳	۳۱.۱	۵.۱۷

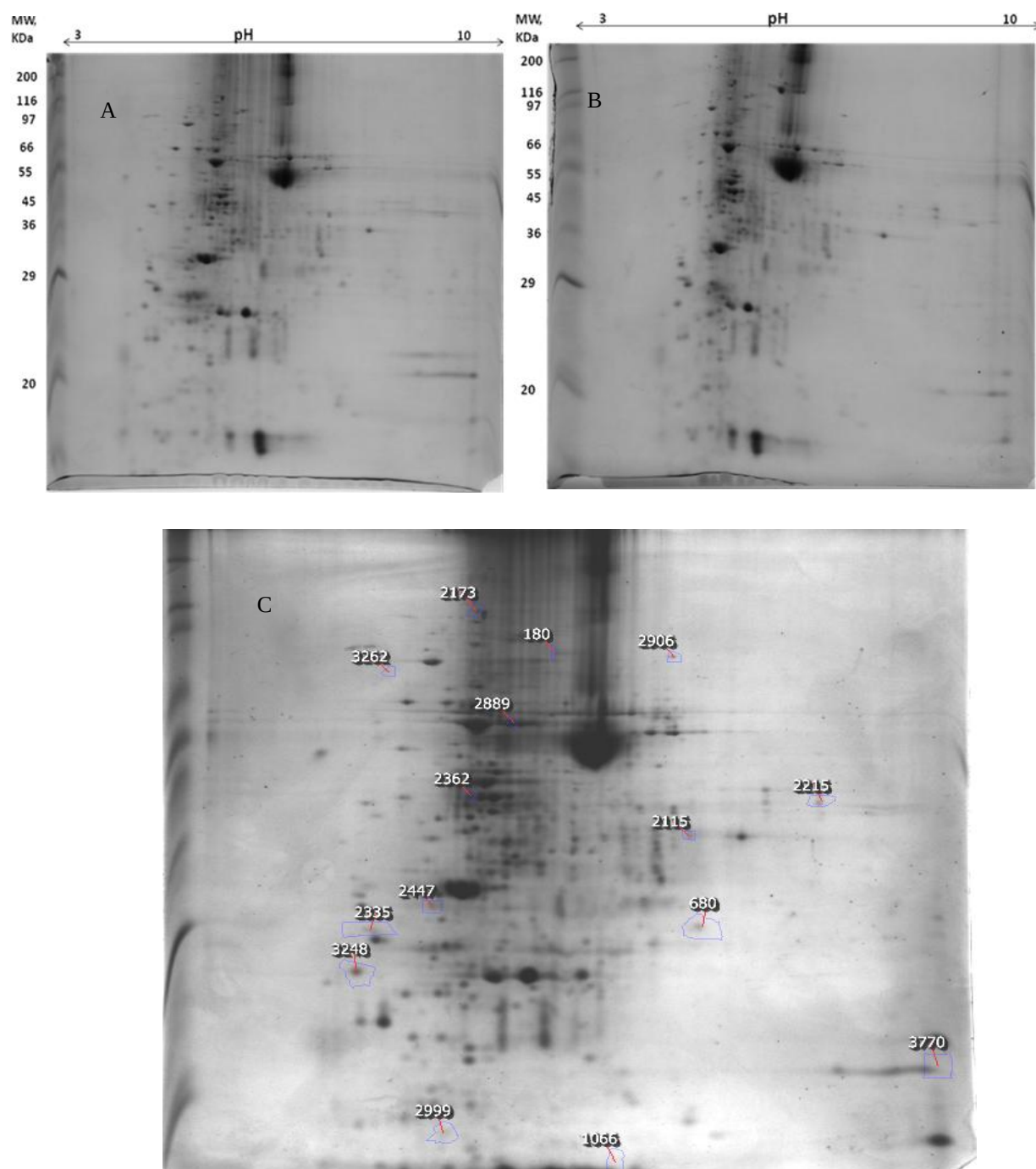


شکل ۱- فراوانی نسبی گروه های عملکردی پروتئین های پاسخ دهنده به تنش سرما در رقم Aths

Fig. 1. The relative frequency of protein functional groups responding to cold stress.

قسمت 3'UTR است که باعث اتصال پروتئین های متصل شونده از جمله CSP41b به این قسمت می شود که CSP41 پیرایش mRNA PetD را انجام داده و باعث ثبات آن می گردد (Yang et al., 1995). بیان این پروتئین همچنین در پاسخ به محرک های رشدی، محیطی، پیری و کم آبی تحت تاثیر قرار می دهد (Raab et al., 2006).

بیان ژن های کلروپلاستی برای تجمع فراورده های فتوسنتزی ضروری می باشد. مجموعه رونویسی و ترجمه نیز به طور قابل توجهی متکی بر پروتئین های کلروپلاستی است که به نوبه خود تا حد زیادی به وسیله فاکتورهای کد کننده هسته ای تنظیم می شوند. گروه های به خصوصی از تنظیم کننده ها شامل پروتئین های هایی هستند که یا RNA را برش می دهند و یا به RNA متصل می شوند و پیرایش RNA را واسطه گری می کنند و باعث ثبات پیرایش و ترجمه می شوند. از پروتئین های کلروپلاستی متصل به RNA که خصوصیات بیوشیمیایی آنها مشخص شده می توان به CSP41 اشاره کرد که دارای همولوگهای a و b می باشد (Bollenbach et al., 2008). در کلروپلاست اسفناج CSP41a هم به عنوان ریبونوکلاز (اتصال به ساختار ساقه- حلقه RNA و برش آن) و هم به عنوان پروتئین متصل شونده به RNA برای فعالیت آن در mRNA30s مطرح شده است (Yang et al., 1996). CSP41b نیز به عنوان همولوگی از CSP41a از گیاه توتون خالص سازی شده (Pfanschmidt et al., 2000) و نشان داده شده که در گیاهچه های آرابیدوپسیس می تواند به RNA متصل شود که RNA هدف این پروتئین PetD RNA می باشد (Raab et al., 2006). ژن PetD کلروپلاستی، کد کننده زیر واحدی از کمپلکس سیتوکروم b6 است که انتقال الکترون بین PSI و PSII را واسطه گری می کند. mRNA این ژن ها همانند بیشتر mRNA های کلروپلاستی، دارای ساختار ساقه حلقه در



شکل ۲- مقایسه الگوی الکتروفورز دو بعدی رقم Aths در شرایط شاهد (A) و تنش سرمای چهار درجه سانتی گراد (B) و لکه‌های پروتئینی دارای تغییر بیان معنی‌دار روی ژل مرجع (C)

Fig. 2. The two-dimensional gel electrophoresis pattern of Aths in the control condition (A), cold stress at 4 °C (B), and protein spots with significant expression changes on the representative gel (C)

علاوه بر وظایف ذکر شده، وظایف دیگری مانند تنظیم سیستم تاریکی و روشنایی کلروپلاست، یکپارچگی کلروپلاست، تجمع واحدهای ریبوزومی و تنظیم هترو پلی ساکاریدها را به این پروتئین نسبت داده‌اند. بنابراین افزایش بیان این پروتئین در شرایط تنش می‌تواند برای مقابله با اثرات تنش سرما صورت گیرد که باعث تخریب کلروپلاست و کاهش رونویسی خواهد شد. از طرف دیگر احتمالاً به صورت غیرمستقیم از طریق افزایش ثبات پروتئین Pet D باعث افزایش انتقال الکترون بین PSI و PSII گردد که این امر ممکن است بدلیل تلاش کلروپلاست برای رسیدن به یک وضعیت بازایی در انتقال الکترون از PSII و تولید انرژی باشد.

لکه شماره ۳۷۷۰ که در واکنش نوری فتوسنتز دخیل است، پروتئین مرکز واکنش فتوسیستم I زیر واحد Photosystem I IV (reaction center subunit IV) می‌باشد که در اثر تنش سرما بیان آن کاهش یافته است. این پروتئین به اختصار PSaE نامیده می‌شود. کمپلکس PSI در بیشتر گیاهان از ۱۳ زیر واحد تشکیل شده است که ۵ زیر واحد آن به وسیله ژنوم کلروپلاستی و هشت زیر واحد آن توسط ژنوم هسته رمز می‌گردند. از زیر واحدهای اصلی آن می‌توان به PSaA PSaB PSaC PSaD و PSaE اشاره کرد. PSaE یک زیر واحد آبدوست در معرض استرومای کلروپلاستی بوده و ۸ کیلو دالتون وزن دارد (Falzone et al., 1994). دارای لوپ یا حلقه ای است که این حلقه با PSaA PSaB و PSaC درگیر است. عملکردهای مختلفی برای PSaE گزارش شده که از آن جمله می‌توان به کمک به اتصال فردوکسین به PSI و بر هم کنش با فردوکسین NADP اکسیدوریداکتاز، اشاره کرد (Andersen et al., 1992). شواهد متعددی نشان داده است که در شرایط سرما و یخ بندان PSI می‌تواند مورد هدف بازدارندگی نوری قرار گیرد که در این حالت زنجیره انتقال الکترونی نامتعادل می‌گردد (Sonoike and Terashima, 1994). از طرف دیگر کاهش فعالیت یا حساسیت PSI به شرایط سرمایی را به علت کاهش توانایی آنزیم‌های آنتی اکسیدان در سم زدایی ROS ها بیان کرده‌اند (Ivanov et al., 1998). به عبارت دیگر افزایش گونه‌های فعال اکسیژن باعث کاهش فعالیت فتوسیستم I می‌گردد. بنابراین

کاهش بیان PSaE در رقم حساس Aths می‌تواند به علت افزایش تولید H_2O_2 و OH- در چرخه مهلر (Mehler) باشد که این کاهش بیان به نوبه خود باعث کاهش اتصال فردوکسین به PSI شده و در انتقال الکترون در زنجیره الکترونی مشکل به وجود می‌آید و باعث کاهش تولید NADPH می‌گردد. گزارشاتی در مورد کاهش فعالیت PSI و اجزای آن در تنش‌های مختلف وجود دارد. در تنش خشکی بر روی گندم کاهش بیان پروتئین PSI subunit PSaC(VII) مشاهده شده است (Ford et al., 2011). قبولی و همکاران (Ghabooli et al., 2013) با بررسی تنش خشکی بر روی جو نیز کاهش فعالیت PSI و PSaC را گزارش کرده‌اند. همچنین کاهش PSaC در شرایط تنش شوری روی برگ جو توسط رسول نیا و همکاران (Rasoulnia et al., 2011) مشاهده گردیده است. در تنش فلزات نیز کاهش PSaC گزارش گردیده (Li et al., 2013) که علت آن را کاهش رنگدانه ها و کاهش فعالیت فتوسنتزی عنوان کرده‌اند.

انتقال الکترون

لکه شماره ۲۱۷۳ مربوط به ATPase زیر واحد بتا کلروپلاستی است که افزایش بیان نشان داده است. ATPase از دو بخش جدا از هم تشکیل شده است یک بخش آبدوست به نام F1 یا CF1 و یک بخش آب گریز به نام F0 یا CF0. F1 یا CF1 دارای پنج زیر واحد آلفا، بتا (لکه شماره ۲۱۷۳ رقم حساس)، گاما، دلتا و اپسیلون است در حالی که CF0 دارای سه زیر واحد a، b و c می‌باشد (Godinot and pietro, 1989; Van Ballmooss and Dimorth, 2007). زیر واحد b نقش مهمی در متابولیسم انرژی به واسطه تبدیل ADP به ATP در صورت وجود شیب پروتون درون غشایی دارد (Ye et al., 2013). وو و همکاران (Wu et al., 2014) در تجزیه پروتئوم برگهای درخت توس تحت تنش سرما اعلام کردند که زیر واحد b، ATPase افزایش بیان داشته است. افزایش بیان زیر واحد بتای این آنزیم در آرابیدوپسیس تحت تیمار سرمایی نیز مشاهده گردیده است (Goulas et al., 2006). در این گزارش اعلام شده که این افزایش بیان به علت فرآیند دفاعی در مقابل تنش سرماست. در پژوهش حاضر می‌توان اظهار نظر کرد که افزایش بیان این آنزیم احتمالاً

احتمالاً می‌تواند به عنوان سازوکاری برای سم زدایی رادیکالهای آزاد در شرایط تنش سرما و مقاومت بخشیدن به این رقم باشد.

افزایش تیوردوکسین کلروپلاستی در برگ گندم در شرایط سرما و یخ بندان (Kosova et al., 2013)، در تجزیه پروتئوم پروتئین‌های برگ گندم در تنش یخ زدگی (Han et al., 2013) گزارش شده است. سرحدی و همکاران نیز در بررسی تنش سرما بر روی دو رقم مقاوم و نیمه مقاوم گندم اعلام نمودند که مقدار تیوردوکسین تیپ M در نیمه مقاوم بیشتر از مقاوم بود (Sarhadi et al., 2010).

مسیر ترارسانی پیام

پروتئین درگیر در این مسیر لکه شماره ۲۴۴۷ رقم حساس *Aths* می‌باشد این پروتئین ۳-۳-۱۴ نام دارد که بیان آن در اثر تنش سرما کاهش نشان داده است. ۳-۳-۱۴ یک خانواده از پروتئین‌های تنظیمی هستند که در یوکاریوت‌ها منحصر به فرد بوده و در تمامی آنها از نظر تکاملی حفاظت شده‌اند و در واکنش‌های پروتئین پروتئین کاملاً درگیر هستند و مسیرهای ترارسانی پیام را واسطه‌گری می‌کنند (Gokirmak et al., 2010). واکنش‌های پروتئین پروتئین نقش اساسی در فرآیندهای سلولی مانند ترارسانی پیام، چرخه سلولی، تنظیم متابولیسم و ساختار پروتئین دارند این خانواده پروتئینی در تنش‌های محیطی نقش ایفا می‌کنند و با انتقال ژنهای این خانواده، مقاومت به تنش خشکی نیز در آرابیدوپسیس القا شده است (Yan et al., 2004). در آرابیدوپسیس، عادت دهی به سرما توسط یک شبکه پیچیده مسیر ترارسانی پیام به وجود می‌آید. یکی از مسیرها به وسیله بیان CBFها واسطه‌گری می‌شود و به طور قابل ملاحظه‌ای سازگاری به سرما را تنظیم می‌کند (Medina et al., 2011). مسیر دیگر ترارسانی علامت مربوط به سرما به وسیله آبسیزیک اسید (ABA) واسطه‌گری می‌شود و این هورمون در پاسخ به سرما افزایش می‌یابد (Lang et al., 1994). علاوه بر ABA تجمع هورمون‌های دیگری مانند اتیلن در آرابیدوپسیس در سازگاری به سرما نیز دخالت دارد به طوری که در چاودار تحمل به انجماد را افزایش می‌دهد (Yu et al., 2001). گزارش شده است که بیان پروتئین‌های ۳-۳-۱۴ در آرابیدوپسیس تولید اتیلن را به وسیله ثابت

به علت درخواست انرژی زیاد سلول برای تقویت بخشیدن گیاه به تنش سرما باشد. افزایش بیان ATP سنتاز در تنش سرمای برنج به مدت ۲۴ ساعت (Cui et al., 2005) گزارش شده است. گزارشاتی نیز در مورد کاهش بیان این پروتئین در تنش سرما ارائه شده است (Jonmohammadi et al., 2014; Rinalduci et al., 2013; Xu et al., 2009; Gao et al., 2011) که علت آنرا تاثیر سرما بر روی تخریب کلروپلاست و یا استراتژی گیاه برای سازگاری با فتوسنتز اعلام کرده‌اند.

یکی دیگر از پروتئین‌های درگیر در این مسیر، لکه شماره ۳۲۴۸ است که مربوط به پروتئین تیوردوکسین میتوکندریایی می‌باشد و در اثر تنش افزایش بیان نشان داده است. تیوردوکسین‌ها (Trxs)، دی سولفید ردوکنازهای کوچک و فراوانی هستند که در تمام موجودات زنده از یوکاریوت‌ها تا یوکاریوت‌های عالی یافت می‌شوند و در تنظیم اکسید و احیا سلولی دخالت دارند (Maeda et al., 2003). این پروتئین‌ها با داشتن یک گروه سولفیدی فعال، نقش تنظیم‌کنندگی را در بسیاری از فرآیندهای سلولی دارند (Laloi et al., 2004). اعتقاد بر این است که در میتوکندری، سیستم تیوردوکسین نقش محوری در تعدیل اکسیداسیون-احیا محیط و تنظیم فعالیت آنزیم هدف از طریق احیا پل دی سولفیدی ایفا می‌کند (Buchman and Balmer, 2005). بوچمن و باسمر (۲۰۰۵) در بررسی فعالیت تیوردوکسین، فهرستی از پروتئین‌های هدف این پروتئین را شناسایی کردند که ۹ پروتئین در سیستم دفاعی آنتی اکسیدان قرار داشتند. از طرفی برانکو و همکاران (۲۰۰۸) نیز اعلام کردند که TRX-O با پراکسیداسیون IIF واکنش نشان داده که تضمینی برای سم زدایی بالای H_2O_2 است. همچنین Trx یک شاخص منفی برای فعالیت اسکوربات پراکسیداز می‌باشد (Gelhay et al., 2006). در کل می‌توان گفت که سیستم تیوردوکسین به طور گسترده با پروتئین‌های آنتی اکسیدان در میتوکندری ارتباط دارد. در پژوهش حاضر، مقدار تیوردوکسین در شرایط تنش سرما افزایش پیدا کرده است و می‌توان پیشنهاد نمود که افزایش این پروتئین در جهت دفاع آنتی اکسیدانی و تنظیم مقاومت در برابر تنش سرما است. با توجه به یافته‌های فیزیولوژی، مقدار H_2O_2 در این رقم در شرایط تنش سرما افزایش نشان داد. بنابراین افزایش مقدار تیوردوکسین

(Chen et al., 2015) گزارش شده است. زیر واحد بزرگ روبیسکو در فرآیندهایی مانند مرگ سلولی، تا خوردگی پروتئین-ها، عکس العمل به سرما و مقاومت اکتسابی نقش ایفا می‌کند (Jonmohammadi et al., 2014). همچنین این افزایش می‌تواند به علت نسبت پائین دی اکسیدکربن به اکسیژن حاصل از کاهش هدایت روزنه‌ای در طی تنش باشد که این آنزیم فعالیت اکسیژنازی خود را برای تنفس نوری آغاز می‌کند (Wingler et al., 2000).

علاوه بر این آنزیم، لکه شماره ۲۳۶۲ مربوط به آنزیم ریبولوز ۱ و ۵- بی فسفات کربوکسیلاز اکتیواز ایزوفرم I است که افزایش بیان داده است. روبیسکو اکتیواز نقش اساسی در تمام سلسله موجودات بازی می‌کند. آنها ممکن است به عنوان مولکولهای چارپرونی در کمک به تجمع یا جداسازی قطعات پروتئینی فعالیت داشته باشند. نقش اصلی این آنزیم حفظ فعالیت روبیسکو است. این آنزیم با هیدرولیز ATP، سایت فعال روبیسکو را از مهار کننده‌های قند فسفاتی مانند ریبولوز ۱ و ۵- بی فسفات دور نگه می‌دارد به طوری که CO_2 به وسیله کربامیلایسون، آنزیم روبیسکو را فعال نگه می‌دارد (Jordan and chollet, 1983; Portis, 2003). در این پژوهش هم آنزیم روبیسکو و هم آنزیم روبیسکو اکتیواز فعال شده اند که احتمالاً افزایش بیان آنزیم روبیسکو به علت افزایش تنفس نوری نبوده بلکه به خاطر افزایش تثبیت CO_2 برای مقاومت در برابر تنش سرما یا رفع هرگونه CO_2 باقی مانده است که این امر از اتلاف انرژی توسط واکنش اکسیژنازی تنفس نوری جلوگیری می‌کند. افزایش بیان روبیسکو اکتیواز در گیاه توت فرنگی (Gua et al., 2013) و گندم (Rinalduci et al., 2011) نیز تحت تنش سرما گزارش شده است و افزایش آن را مربوط به نقش این آنزیم در حفظ شکل فعال روبیسکو دانسته اند. پارتیس و همکاران (Portis et al., 2008) نیز اعلام کرده اند که مجموعه ای از تغییرات بین روبیسکو اکتیواز و زیر واحد بزرگ و کوچک روبیسکو، می‌تواند اکتیواز را برای کربامیلایسون قابل دسترس‌تر کند که نتیجه این افزایش فعالیت اکتیواز، تثبیت CO_2 برای مقاومت در برابر تنش سرما است. از طرف دیگر می‌توان چنین استنباط کرد که با توجه به اینکه PSI تحت تنش سرما در رقم حساس Aths کاهش یافته است و

ایزوفرم‌های ACS (پیش ماده اتیلن) افزایش می‌دهد (Yoon and Kieber, 2013). با توجه به مطالب ذکر شده، در این پژوهش، اگر پروتئین ۳-۱۴ به عنوان تنظیم کننده رونویسی آبسزیک اسید ایفای نقش کند، با کاهش بیان باعث کاهش تولید و تجمع ABA و متعاقباً باعث کاهش تحمل به سرما شده است و اگر به عنوان تثبیت کننده ACS در نظر بگیریم، با کاهش بیان باعث کاهش ثبات پیش ماده تولید اتیلن و در نتیجه کاهش مقدار اتیلن می‌شود و موجب حساسیت در برابر تنش سرما می‌گردد. پس احتمالاً یکی از عوامل حساسیت رقم Aths به تنش سرما می‌تواند به علت کاهش بیان این پروتئین بوده باشد. کاهش بیان این پروتئین در لاین های گندم تحت تنش سرما نیز گزارش شده است (Vitamvase et al., 2012). البته در یک بررسی دیگر بر روی گندم های زمستانه نیز کاهش بیان این پروتئین بیان مشاهده شده بود (Vitamvas et al., 2007) افزایش بیان این پروتئین در گندم تحت سرمای بهاره توسط هان و همکاران (۲۰۱۳) نیز اعلام شده و پیشنهاد شده که این پروتئین نقش مهمی در مسیرهای ترانسسانی پیام برای تنظیم بیان ژن در تنش سرما ایفا می‌کند.

چرخه کالوین

لکه شماره ۱۸۰ زیر واحد بزرگ روبیسکو را نشان می‌دهد. روبیسکو آنزیم کلیدی مسئول تثبیت کربن فتوسنتزی است و فراوان ترین پروتئین در گیاهان می‌باشد و ۱۲ الی ۳۵ درصد از کل پروتئین‌های برگ و ۵۰ درصد از پروتئین‌های محلول را به خصوص در گیاهان C3 تشکیل می‌دهد (Zhaug et al., 2014). این لکه در شرایط سرما نسبت به شاهد افزایش بیان دارد. در این مطالعه وزن مولکولی این آنزیم حدود ۵۳/۷ کیلو دالتون می‌باشد. لکه روبیسکو معمولاً به صورت نواری در pH ۶ تا ۷ مشاهده می‌شود. ولی در ژل مورد مطالعه، این آنزیم به صورت نواری نیست و احتمالاً توسط ROSها تخریب شده است. یان و همکاران (Yan et al., 2006) نیز قطعات تخریب شده از زیر واحد بزرگ روبیسکو را که توسط دمای کم، افزایش بیان نشان داده بود را شناسایی کردند. افزایش بیان زیر واحد بزرگ روبیسکو در مرحله رویشی گندم در آخر پائیز (Jonmohammadi et al., 2014)، در رقم مقاوم گندم تحت تنش یخ زدگی -8°C (Xu et al., 2013) و در تنش سرمای 4°C به مدت ۷ روز در برگ یونجه

رونویسی در شرایط تنش می‌شوند. ATPase نیز به علت فرآیند دفاعی در مقابل تنش سرما و همچنین درخواست انرژی زیاد سلولها برای مقابله با این تنش افزایش بیان نشان می‌دهد. تیورودوکسین میتوکندریایی با افزایش بیان باعث سم زدایی رادیکالهای آزاد و دفاع آنتی اکسیدانی در تنش سرما می‌شود. افزایش بیان آنزیم‌های چرخه کالوین برای افزایش تثبیت CO₂ باقی‌مانده تثبیت شود و در برابر تنش سرما مقاومت نشان دهد.

به طور کلی چنین نتیجه گیری می‌شود که تنش سرمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت بر روی جو بهاره باعث تغییر بیان پروتئین‌ها به صورت افزایش و کاهش بیان می‌گردد. از بین این پروتئین‌ها، پروتئین‌های کلروپلاستی با افزایش بیان در صدد کاهش اثرات تنش سرما به گیاه هستند. این پروتئین‌ها در تنظیم سیستم تاریکی و روشنایی کلروپلاست و یکپارچگی آن نقش دارند و با تجمع واحدهای ریبوزومی باعث افزایش

واکنش نوری فتوسنتزی مهار شده، رویسکو وارد چرخه تنفس نوری شده و افزایش بیان نشان داده است که محصولات تنفس باعث بسته شدن سایت فعال رویسکو شده (Pears and Andrews, 2003) و آنزیم رویسکو اکتیواز با افزایش بیان این سایت را آزاد نگه می‌دارد (Portis and Parry, 2007) تا CO₂ باقی مانده تثبیت شود و در برابر تنش سرما مقاومت نشان دهد.

به طور کلی چنین نتیجه گیری می‌شود که تنش سرمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت بر روی جو بهاره باعث تغییر بیان پروتئین‌ها به صورت افزایش و کاهش بیان می‌گردد. از بین این پروتئین‌ها، پروتئین‌های کلروپلاستی با افزایش بیان در صدد کاهش اثرات تنش سرما به گیاه هستند. این پروتئین‌ها در تنظیم سیستم تاریکی و روشنایی کلروپلاست و یکپارچگی آن نقش دارند و با تجمع واحدهای ریبوزومی باعث افزایش

منابع

- Andersen B, Scheller HV, Møller BL. 1992. The PSI-E subunit of photosystem I binds ferredoxin: NADP+ oxidoreductase. FEBS letters 311(2):169-173.
- Barranco-Medina S, Krell T, Bernier-Villamor L, Sevilla F, Lázaro JJ, Dietz KJ. 2008. Hexameric oligomerization of mitochondrial peroxiredoxin PrxIIIF and formation of an ultrahigh affinity complex with its electron donor thioredoxin Trx-o. Journal of experimental botany 59(12):3259-3269.
- Bollenbach TJ, Sharwood RE, Gutierrez R, Lerbs-Mache S, Stern DB. 2009. The RNA-binding proteins CSP41a and CSP41b may regulate transcription and translation of chloroplast-encoded RNAs in Arabidopsis. Plant Molecular Biology 69:541-552.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72(1):248-254.
- Buchanan BB, Balmer Y. 2005. Redox regulation: a broadening horizon. Annual Review of Plant Biology 56:187-220.
- Chen J, Han G, Shang C, Li J, Zhang H, Liu F, Wang J, Liu H, Zhang Y. 2015. Proteomic analyses reveal differences in cold acclimation mechanisms in freezing-tolerant and freezing-sensitive cultivars of alfalfa. Frontiers in Plant Science 6:18-30
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. Trends in Plant Science 12(10):444-451.
- Cui S, Huang F, Wang J, Ma X, Cheng Y, Liu J. 2005. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. Proteomics 5(12):3162-3172.
- Falzone CJ, Kao YH, Zhao J, Bryant DA, Lecomte JT. 1994. Three-dimensional solution structure of Psae from the cyanobacterium Synechococcus sp. strain PCC 7002, a photosystem I protein that shows structural homology with SH3 domains. Biochemistry 33(20):6052-6062.
- Ford KL, Cassin A, Bacic A. 2011. Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance. Frontiers in Plant Science 2:44.
- Galiba G, Vágújfalvi A, Li C, Soltész A, Dubcovsky J. 2009. Regulatory genes involved in the determination of frost tolerance in temperate cereals. Plant Science 176(1):12-19.
- Gao F, Zhou Y, Zhu W, Li X, Fan L, Zhang G. 2009. Proteomic analysis of cold stress-responsive proteins in Thellungiella rosette leaves. Planta 230(5):1033-1046.
- Gelhay E, Navrot N, Macdonald IK, Rouhier N, Raven EL, Jacquot JP. 2006. Ascorbate peroxidase-thioredoxin interaction. Photosynthesis Research 89(2-3): 193-200.
- Ghabooli M, Khatabi B, Ahmadi FS, Sepehri M, Mirzaei M, Amirkhani A, Jorrín-Novo JV, Salekdeh GH. 2013. Proteomics study reveals the molecular mechanisms underlying water stress tolerance induced by Piriformospora indica in barley. Journal of Proteomics 94:289-301.
- Gharechahi J, Alizadeh H, Naghavi MR, Sharifi G. 2014. A proteomic analysis to identify cold acclimation associated proteins in wild wheat

- (*Triticum urartu* L.) . Molecular Biology Reports 41(6):3897-3905.
- Godinot C, Di Pietro A. 1986.** Structure and function of the ATPase-ATP synthase complex of mitochondria as compared to chloroplasts and bacteria. *Biochimie* 68(3): 367-374.
- Gökirmak T, Paul AL, Ferl RJ. 2010.** Plant phosphopeptide-binding proteins as signaling mediators. *Current Opinion in Plant Biology* 13(5):527-532.
- Gomat HY, Deleporte P, Moukini R, Mialounguila G, Ognouabi N, Saya AR et al. 2011.** What factors influence the stem taper of eucalyptus: growth, environmental conditions, or genetics? *Annals of Forest Science* 68:109-120.
- Goulas E, Schubert M, Kieselbach T, Kleczkowski LA, Gardeström P, Schröder W, Hurry V. 2006.** The chloroplast lumen and stromal proteomes of *Arabidopsis thaliana* show differential sensitivity to short-and long-term exposure to low temperature. *The Plant Journal* 47(5):720-734.
- Gu X, Gao Z, Zhuang W, Qiao Y, Wang X, Mi L, Zhang Z, Lin Z. 2013.** Comparative proteomic analysis of rd29A: RdreB1BI transgenic and non-transgenic strawberries exposed to low temperature. *Journal of Plant Physiology* 170(7):696-706.
- Gusta LV, Fowler DB. 1976.** Effects of temperature on dehardening and rehardening of winter cereals. *Canadian Journal of Plant Science* 56(3):673-678.
- Han Q, Kang G, Guo T. 2013.** Proteomic analysis of spring freeze-stress responsive proteins in leaves of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 63:236-244.
- Heidarvand L, Amiri RM. 2010.** What happens in plant molecular responses to cold stress? *Acta Physiologiae Plantarum* 32(3):419-431.
- Hlaváčková I, Vítámvás P, Šantrůček J, Kosová K, Zelenková S, Prášil IT, Ovesná J, Hynek R, Kodíček M. 2013.** Proteins involved in distinct phases of cold hardening process in frost resistant winter barley (*Hordeum vulgare* L.) cv Luxor. *International Journal of Molecular Sciences* 14(4):8000-8024.
- Ivanov AG, Morgan RM, Gray GR, Velitchkova MY, Huner NPA. 1998.** Temperature/light dependent development of selective resistance to photoinhibition of photosystem I. *FEBS Letters* 430(3):288-292.
- Janmohammadi M, Matros A, Mock HP. 2014.** Proteomic analysis of cold acclimation in winter wheat under field condition. *Icelandic Agricultural Sciences* 27:3-15.
- Jordan DB, Chollet R. 1983.** Inhibition of ribulose biphosphate carboxylase by substrate ribulose 1, 5-bisphosphate. *Journal of Biological Chemistry* 258(22):13752-13758.
- Kosová K, Vítámvás P, Prášil IT. 2014.** Proteomics of stress responses in wheat and barley-search for potential protein markers of stress tolerance. *Frontiers in Plant Science* 5(711):10-3389.
- Kosová K, Vítámvás P, Planchon S, Renaut J, Vanková R, Prášil IT. 2013.** Proteome analysis of cold response in spring and winter wheat (*Triticum aestivum*) crowns reveals similarities in stress adaptation and differences in regulatory processes between the growth habits. *Journal of Proteome Research* 12(11):4830-4845.
- Laloi C, Mestres-Ortega D, Marco Y, Meyer Y, Reichheld JP. 2004.** The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiology* 134(3):1006-1016.
- Lang V, Mantyla E, Welin B, Sundberg B, Palva ET. 1994.** Alterations in water status, endogenous abscisic acid content, and expression of rab18 gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 104(4):1341-1349
- Li G, Peng X, Xuan H, Wei L, Yang Y, Guo T, Kang G. 2013.** Proteomic analysis of leaves and roots of common wheat (*Triticum aestivum* L.) under copper-stress conditions. *Journal of Proteome Research* 12(11):4846-4861.
- Maeda K, Finnie C, Østergaard O, Svensson B. 2003.** Identification, cloning and characterization of two thioredoxin h isoforms, HvTrxh1 and HvTrxh2, from the barley seed proteome. *European Journal of Biochemistry* 270(12):2633-2643.
- Medina J, Catalá R, Salinas J. 2011.** The CBFs: three *Arabidopsis* transcription factors to cold acclimate. *Plant Science* 180(1):3-11.
- Pearce FG, Andrews TJ. 2003.** The relationship between side reactions and slow inhibition of ribulose-bisphosphate carboxylase revealed by a loop 6 mutant of the tobacco enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 278(35):32526-32536.
- Pfannschmidt T, Ogrzewalla K, Baginsky S, Sickmann A, Meyer HE, Link HE. 2000.** The multisubunit chloroplast RNA polymerase A from mustard (*Sinapis alba* L.). *European Journal of Biochemistry* 267(1):253-261.
- Portis Jr AR, Parry MA. 2007.** Discoveries in Rubisco (Ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective. *Photosynthesis Research* 94(1):121-143.
- Portis Jr AR. 2003.** Rubisco activase–Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynthesis Research* 75(1):11-27.
- Portis AR, Li C, Wang D, Salvucci ME. 2008.** Regulation of Rubisco activase and its interaction with Rubisco. *Journal of Experimental Botany* 59(7):1597-1604.
- Raab S, Toth Z, de Groot C, Stammering T, and Hoth S. 2006.** ABA-responsive RNA-binding proteins are involved in chloroplast and stromule function in *Arabidopsis* seedlings. *Planta* 224(4):900-914.
- Rasoulnia A, Bihamta MR, Peyghambari SA, Alizadeh H, Rahnema A. 2011.** Proteomic response of barley leaves to salinity. *Molecular Biology Reports* 38(8):5055-5063.
- Rinalducci S, Egidi MG, Karimzadeh G, Jazii FR, Zolla L. 2011.** Proteomic analysis of a spring wheat

- cultivar in response to prolonged cold stress. *Electrophoresis* 32(14):1807-1818.
- Sarhadi E, Mahfoozi S, Hosseini SA, Salekdeh GH. 2010.** Cold acclimation proteome analysis reveals close link between the up-regulation of low-temperature associated proteins and vernalization fulfillment. *Journal of Proteome Research* 9(11):5658-5667.
- Shroyer JP, Mikesell ME, Paulsen GM. 1995.** Spring freeze injury to Kansas wheat. Cooperative Extension Service, Kansas State University.
- Sonoike K, Terashima I. 1994.** Mechanism of photosystem-I photoinhibition in leaves of *Cucumis sativus* L. *Planta* 194(2):287-293.
- Vítámvás P, Prášil IT, Kosova K, Planchon S, and Renaut J. 2012.** Analysis of proteome and frost tolerance in chromosome 5A and 5B reciprocal substitution lines between two winter wheats during long-term cold acclimation. *Proteomics* 12(1):68-85.
- Vítámvás P, Saalbach G, Prášil IT, Čapková V, Opatrná J, Ahmed J. 2007.** WCS120 protein family and proteins soluble upon boiling in cold-acclimated winter wheat. *Journal of Plant Physiology* 164(9):1197-1207.
- Von Ballmoos C, Dimroth P. 2007.** Two distinct proton binding sites in the ATP synthase family. *Biochemistry* 46(42):11800-11809.
- Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC. 2000.** Photorespiration: metabolic pathway and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 335(1402):1517-1529.
- Xu W, Rosenow DT, Nguyen HT. 2000.** Stay green trait in grain sorghum: relationship between visual rating and leaf chlorophyll concentration. *Plant Breeding* 119(4):365-367.
- Xu J, Li Y, Sun J, Du L, Zhang Y, Yu Q, Liu X. 2013.** Comparative physiological and proteomic response to abrupt low temperature stress between two winter wheat cultivars differing in low temperature tolerance. *Plant Biology* 15(2):292-303.
- Yan J, He C, Wang J, Mao Z, Holaday SA, Allen RD, Zhang H. 2004.** Overexpression of the Arabidopsis 14-3-3 protein GF14 λ in cotton leads to a "stay-green" phenotype and improves stress tolerance under moderate drought conditions. *Plant and Cell Physiology* 45(8):1007-1014.
- Yan SP, Zhang QY, Tang ZC, Su WA, Sun WN. 2006.** Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Molecular and Cellular Proteomics* 5(3):484-496.
- Yang J, Schuster G, Stern DB. 1996.** CSP41, a sequence-specific chloroplast mRNA binding protein, is an endoribonuclease. *The Plant Cell* 8(8):1409-1420.
- Yang J, Usack L, Monde RA, Stern DB. 1994.** The 41 kDa protein component of the spinach chloroplast petD mRNA 3'stem-loop: protein complex is a nuclear encoded chloroplast RNA-binding protein. *Nucleic Acids Symposium Series* 33:237-239.
- Ye J, Wang S, Zhang F, Xie D, Yao Y. 2013.** Proteomic analysis of leaves of different wheat genotypes subjected to PEG 6000 stress and rewatering. *Plant Omics* 6(4):286.
- Yoon GM, Kieber JJ. 2013.** 14-3-3 regulates 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase protein turnover in Arabidopsis. *The Plant Cell* 25(3):1016-1028.
- Yu XM, Griffith M, Wiseman SB. 2001.** Ethylene induces antifreeze activity in winter rye leaves. *Plant Physiology* 126(3):1232-1240.
- Zhang M, Lv D, Ge P, Bian Y, Chen G, Zhu G, Li X, Yan Y. 2014.** Phosphoproteome analysis reveals new drought response and defense mechanisms of seedling leaves in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Proteomics* 109:290-308.
- Zhong X, Mei X, Li Y, Yoshida H, Zhao P, Wang X, Han L, Hu X, Huang S, Huang J, Sun Z. 2008.** Changes in frost resistance of wheat young ears with development during jointing stage. *Journal of Agronomy and Crop Science* 194(5):343-349.

Proteomic Analysis of Spring Barley Leaves Under Short Term Cold Stress

Rana valizadeh kamran^{1,2}, Mahmood Toorchi^{1*}, Mohammad Moghaddam¹, Hamid Mohammadi³

1. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2. Department of Biotechnology and 3. Department of Agronomy - Faculty of Agriculture Azarbaijan Shahid Madani University, km35 Tabriz-Maragheh Road

* Corresponding Author, Email: mtoorchi@tabrizu.ac.ir

ABSTRACT

Cold is one of the most significant abiotic stresses which restrict crop growth and productivity worldwide. In order to investigate how spring barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings adapt to short-term periods of low temperature, the present study explored proteomic changes in leaves. Cold stress at 4 °C was applied to barley seedlings for 48 hours; third leaves were harvested and compared with seedlings grown in normal conditions (25° C). The proteomic analysis was conducted by two-dimensional electrophoresis (2-DE) and the Coomassie blue staining procedure. Fifteen reproducible protein spots showing a significant difference between the control condition and cold stress were identified; 10 of the spots demonstrated an increase in expression while 5 spots showed a decrease under 4 °C cold stress for 48 hours. By applying MALDI-TOF analysis, 7 spots were identified. These responsive proteins were involved in the Calvin cycle, photosynthetic electron transport, light reaction, and signal transduction. The upregulation of proteins involved in the regulation of the chloroplast system, the integrity of chloroplasts, energy metabolism, antioxidant defense, and photosynthesis has probably acclimatized the plant to cold stress. These findings indicate that there was greater cold stress affecting photosynthesis in spring barley and it is of crucial importance to maintain the efficiency of photosynthesis under cold stress.

Key Words

Barley, Cold, Proteome, 2DE, MALDI-TOF