مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره چهارم، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۴
صفحه ۷۸-۶۷

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

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

رعنا ولی زاده کامران[۱و۲]، محمود تورچی[۱*]، محمد مقدم[۱] و حمید محمدی[۳]

Rana valizadeh kamran[1,2], Mahmood Toorchi[1*], Mohammad Moghaddam[1], Hamid Mohammadi[3]

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 وکاهش تولید محصول در مناطق سردسیر و معتدل می‌شود. برای درک مکانیسم مولکولی سازش گیاهچه‌های جو بهاره با سرمای کوتاه مدت، تغییرات پروتئومی برگ جو مورد مطالعه قرار گرفت. به این منظور سرمای 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 سرمای 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 ترارسانی 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 می‌باشد. گیاهان وقتی در معرض دماهای پائین قرار می‌گیرند برای تطبیق خود با تنش و افزایش تحمل به سرما بسیاری از تغیرات فیزیولوزیکی و بیوشیمیایی را در خود ایجاد می‌نمایند (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 می‌رساند و عملکرد آنها را حدود ۳۰ تا ۵۰ درصد کاهش می‌دهد (Shroyer *et al*. 1995; Zhong *et al*. 2008). خطر سرمای بهاره در اغلب برنامه‌های 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 گسترده‌ای از پاسخ‌های فیزیو-بیوشیمیایی و تغییرات بیان ژن در گیاهان می‌شود (Chinnusamy *et al*. 2007; Heidarvand (and Maali Amiri, 2010 که باعث تحمل گیاه به تنش سرما می‌شوند. پروتئین‌ها نقش بسیار مهمی را در پاسخ گیاهان به تنش ایفا می‌کنند چرا که در تغییرات ساختاری و هم تغییرات متابولیکی گیاه نقش دارند. پروتئین‌ها در تنش سرمای گندم و جو در قسمت‌های سوخت وساز انرژی، فتوسنتز، مهار گونه‌های فعال اکسیژن، تنظیم چرخه سلولی، رشد گیاه و حفاظت در برابر تنش درگیر هستند (Kosová *et al*. 2014). مطالعات پروتئومی باعث شناسایی پروتئین‌های 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 تلاش‌های زیاد در مورد درک پروتئین‌های 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 پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش با استفاده از راهکار پروتئومیکس می‌باشد. استفاده از این اطلاعات در کنار سایر تکنیک‌های مولکولی ضمن شناسایی دقیق‌تر اثرات تنش سرما بر گیاه و مکانیسم مولکولی مقاومت به تنش سرما، می‌تواند بستر مناسبی را جهت بهبود صفت تحمل به سرما را در جو و گیاهان مشابه فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

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 کاملا تصادفی کشت شدند. بذور در مخلوط پرلیت و ماسه به نسبت ۵ به ۲ در گلدان کاشته شد. گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد، رطوبت ۷۰٪ و طول روز ۱۶ ساعت قرار گرفتند و تا زمان رسیدن به مرحله سه برگی هر روز آبیاری شدند. زمانی‌که گیاهان به مرحله سه برگی رسیدند، تنش سرمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال قابل برنامه‌ریزی سرما روی تعدادی از گلدان‌ها به‌صورت تصادفی به‌مدت 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 می‌گرفتند 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 میلی‌لیتر (۱۰۰٪) TCA، ۴۵ میلی‌لیتر 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 به‌دست آمده بافر لیز (اوره، تیو اوره، چپس، آمفولین ۱۰-۳ pH) اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه ورتکس گردید. سپس سانتریفوژ در

دمای ۲۵°C با دور ۲۰۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد و محلول روئی جمع‌آوری 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 آکریلامید ۳۰٪، NP-40، آمفولین‌های با pH(۳-۱۰) و pH(۵-۸)، APS و TEMED استفاده شد. الکتروفورز بعد اول طی سه مرحله به‌ترتیب 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 می‌شوند. 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 آکریلامید 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 برومومفنول 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 میلی‌آمپر 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 دانسیومتر GS800 ساخت شرکت Bio-Rad تصویربرداری شدند و سپس توسط نرم افزار PDQust مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و لکه های دارای تغییر بیان معنی‌دار 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 معنی‌دار 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 ترارسانی پیام ۱۴/۲۵٪ از پروتئین‌ها را به خود اختصاص دادند. لکه‌های پروتئینی دارای تغییر بیان در شکل ۲ نشان داده شده است.

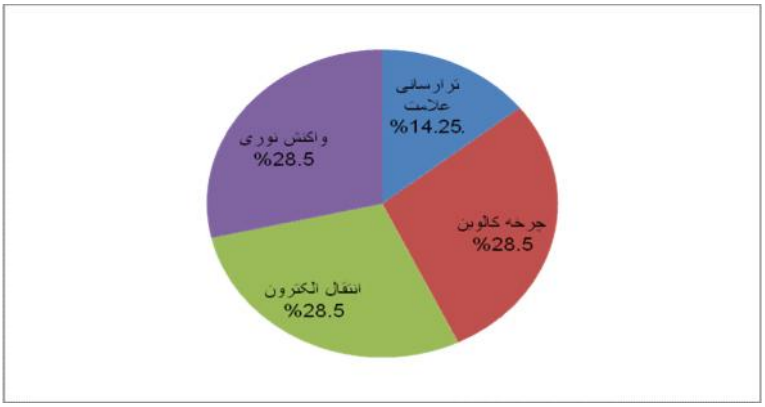
پروتئین‌های دخیل در واکنش نوری فتوسنتز

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

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

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

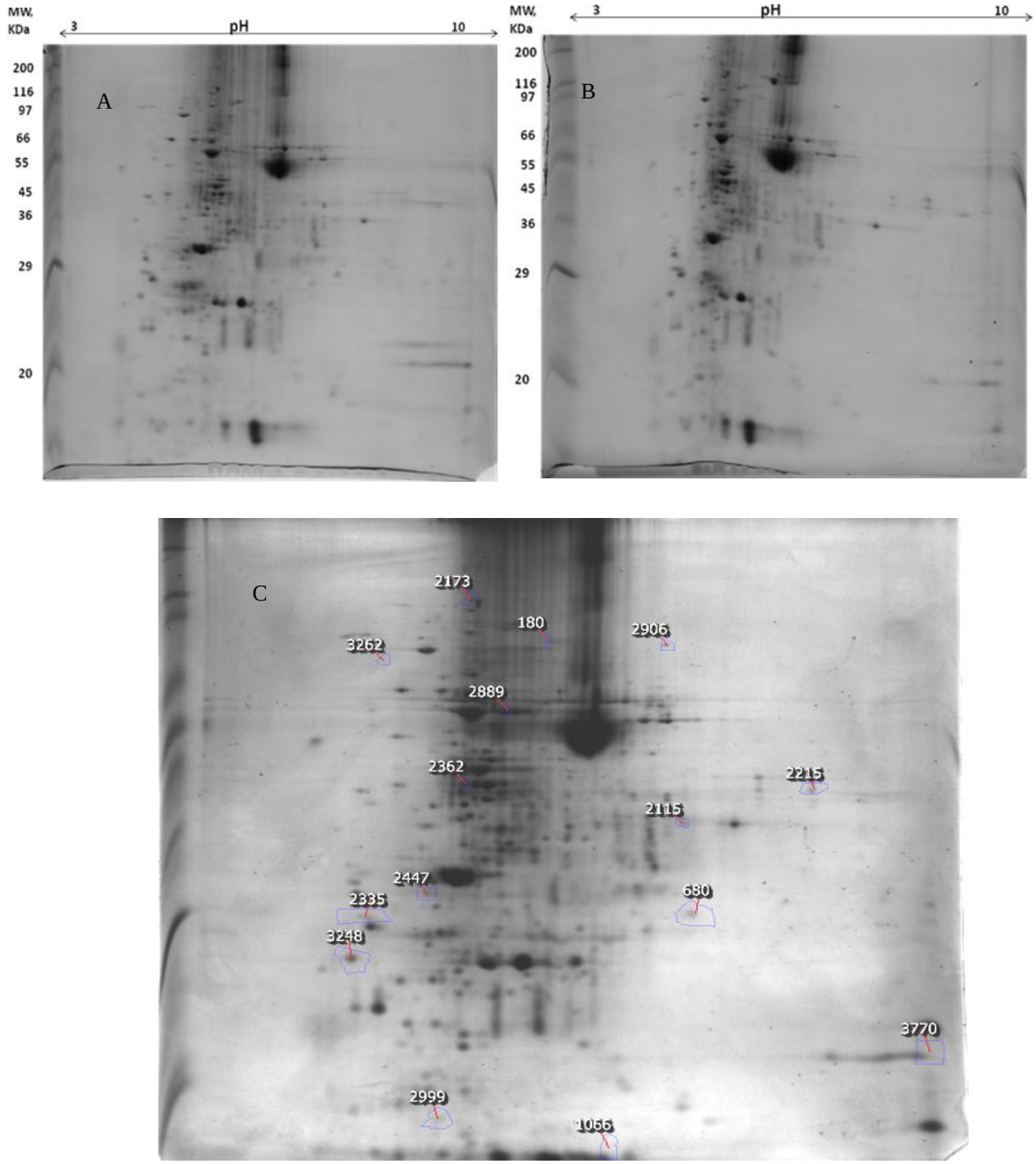
Experimental pI	Experimental MW (kDa)	Theorical pI	Theorical MW (kDa)	.Accession No	طبقه بندی	نام پروتئین	Score	شماره لکه	گروه عملکردی
۵.۶	۱۱۴.۱	۵.۱۱	۵۳.۸۹۹	gi|11583	Hordeum vulgare	ATPase beta subunit chloroplast	۱۶۷	**۲۱۷۳**	انتقال الکترون
۴.۴	۲۷.۲	۹.۴۱	۲۰.۳۴۱	gi | 329750617	Hevea brasiliensis	Mitochondrial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



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.

بیان ژن‌های کلروپلاستی برای تجمع فراورده‌های فتوسنتزی ضروری می‌باشد. مجموعه رونویسی و ترجمه نیز به طور قابل توجهی متکی بر پروتئین‌های کلروپلاستی است که به نوبه خود تا حد زیادی به وسیله فاکتورهای کد کننده هسته ای تنظیم می-شوند. گروه‌های به خصوصی از تنظیم کننده‌ها شامل پروتئین-هایی هستند که یا RNA را برش می‌دهند و یا به RNA متصل می‌شوند و پیرایش RNA را واسطه گری می‌کنند و باعث ثبات پیرایش و ترجمه می‌شوند. از پروتئین‌های کلروپلاستی متصل به RNA که خصوصیات بیوشیمیایی آنها مشخص شده می‌توان به CSP41 اشاره کرد که دارای همولوگهای a و b می‌باشد (Bollenbach *et al*., 2008). در کلروپلاست اسفناج CSP41a هم به عنوان ریبونوکلئاز (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 (Pfanschimidt *et al*., 2000) و نشان داده شده که در گیاهچه‌های آرابیدوپسیس می‌تواند به RNA متصل شود که RNA هدف این پروتئین PetD RNA می‌باشد (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 می‌کند. mRNA این ژن‌ها همانند بیشتر mRNAهای کلروپلاستی، دارای ساختار ساقه حلقه در قسمت ۳'UTR است که باعث اتصال پروتئین‌های متصل شونده از جمله CSP41b به این قسمت می‌شود که CSP41 پیرایش mRNA PetD را انجام داده وباعث ثبات آن می‌گردد (Yang *et al*., 1995). بیان این پروتئین همچنین در پاسخ به محرک های رشدی، محیطی، پیری و کم آبی تحت تاثیر قرار می‌دهد (Raab *et al*., 2006).



شکل ۲- مقایسه الگوی الکتروفورز دو بعدی رقم Aths در شرایط شاهد (A) و تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد (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 پلی‌ساکاریدها 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 PSII و PSI گردد که این امر ممکن است بدلیل تلاش کلروپلاست برای رسیدن به یک وضعیت بازیابی 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 می-شود. 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 PSaB، PSaA 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 اپیسیلون 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 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 ، 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

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*., 2011; Gao *et al*., 2009; Xu *et al*., 2013) که علت آنرا تاثیر سرما بر روی تخریب کلروپلاست و یا استراتژی گیاه برای سازگاری با فتوسنتز اعلام کرده اند.

یکی دیگر از پروتئین‌های درگیر در این مسیر، لکه شماره ۳۲۴۸ است که مربوط به پروتئین تیوردوکسین میتوکندریایی می باشد و در اثر تنش افزایش بیان نشان داده است. تیوردوکسین‌ها (Trxs)، دی سولفید ردوکتازهای کوچک و فراوانی هستند که در تمام موجودات زنده از پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت های 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 تنظیم کنندگی را در بسیاری از فرآیندهای سلولی دارند (Laloi *et al*., 2004). اعتقاد بر این است که در میتوکندری، سیستم تیوردوکسین نقش محوری درتعدیل 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 (Gelhaye *et al*., 2006). در کل می‌توان گفت که سیستم تیوردوکسین به طور گسترده با پروتئین-های 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 یافته های فیزیولوژی، مقدار H_2O_2 در این رقم در شرایط تنش سرما افزایش نشان داد. بنابراین افزایش مقدار تیوردوکسین احتمالا 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 یوکاریوت ها 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 واسطه گری 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 واسطه گری می‌شود و به طور قابل ملاحظه ای سازگاری به سرما را تنظیم می‌کند (Medina *et al*., 2011). مسیر دیگر ترارسانی علامت مربوط به سرما به وسیله آبسیزیک اسید (ABA) واسطه گری می‌شود و این هورمون در پاسخ به سرما افزایش می-یابد (Lang *et al*., 1994). علاوه بر ABA تجمع هورمون های 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 پروتئین-های ۳-۳-۱۴ در آرابیدوپسیس تولید اتیلن را به وسیله ثبات

ایزوفرم‌های ACS (پیش ماده اتیلن) افزایش می‌دهد (Yoon and Kieber, 2013). با توجه به مطالب ذکر شده، در این پژوهش، اگر پروتئین ۳-۳-۱۴ به عنوان تنظیم کننده رونویسی آبسیزیک 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 ترارسانی 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 ۸°C- (Xu *et al*., 2013) و در تنش سرمای ۴°C به مدت ۷ روز در برگ یونجه (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 چاپرونی 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 کربامیلاسیون، 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) نیزتحت 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 اکیتواز را برای کربامیلاسیون 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

واکنش نوری فتوسنتزی مهار شده، روبیسکو وارد چرخه تنفس نوری شده و افزایش بیان نشان داده است که محصولات تنفس باعث بسته شدن سایت فعال روبیسکو شده (Pears and Andrews, 2003) و آنزیم روبیسکو اکتیواز با افزایش بیان این سایت را آزاد نگه می‌دارد (Portis and Parry., 2007) تا CO_2 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، پرروتئین‌های 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 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 CO_2 باقی‌مانده جهت ثبات فتوسنتز است. پروتئین‌های اجزای فتوسیستم I تحت تاثیر سرما قرار می‌گیرند و بیان آنها کاهش می-یابد که این امر باعث اختلال در انتقال الکترون در زنجیره الکترونی می‌شود.به عبارت دیگر می‌توان گفت که گیاه در برابر تنش سرما با افزایش بیان پروتئین‌ها به این تنش پاسخ می دهدو بیشتر پروتئین‌های درگیر در تنش سرما مربوط به سیستم فتوسنتزی می‌باشد.

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 PrxIIF 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.

Gelhaye 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 bisphosphate 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 G. 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, Stamminger 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, Rahnama 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 GF14λ 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.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol4, Number1, Spring and summer 2015, Bi-seasonal

Proteomic Analysis of Spring Barley Leaves Under Short Term Cold Stress

Rana valizadeh kamran[1,2], Mahmood Toorchi[1]*, Mohammad Moghaddam[1], Hamid Mohammadi[3]

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