

مقایسه پروفایل پروتئومیکس برگ دو ژنوتیپ چچم چند ساله (*Lolium perenne*) تحت تنش خشکی

فاطمه رئیسی وانانی^۱، لیلا شبانی^{۱*}، محمدرضا سبزیعلیان^۳ و فریبا دهقانان^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، پژوهشکده زیست‌فناوری، دانشگاه شهرکرد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، بخش ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۱۷، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۴/۲۶)

چکیده

تنش خشکی یکی از تهدیدهای اصلی کاهش‌دهنده عملکرد گیاهان است. در نتایج تحقیقات مختلف بیان شده آلودگی به اندوفایت می‌تواند تحمل به تنش خشکی را در گونه‌های علفی میزبان افزایش دهد، اما چگونگی این اثر مشخص نیست. یکی از ابزارهای مفید در فهم مکانیسم‌های مولکولی مقاومت به خشکی، آنالیز پروتئومیکس است. در این آزمایش با استفاده از راهکار پروتئومیکس بیان پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در برگ‌های دو ژنوتیپ *Lolium perenne* بررسی شد. تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی و آزمایش فاکتوریل و با دو فاکتور ژنوتیپ S10 (آلوده به قارچ اندوفایت) و Speedy (بدون حضور قارچ) و تنش خشکی در دو سطح کنترل و ۸۰٪ تخلیه رطوبت انجام شد. برای شناسایی پروتئین‌ها، در ابتدا پروتئین کل براساس روش TCA-استون از برگ استخراج شد و با الکتروفورز SDS-PAGE جداسازی پروتئین‌های محلول کل خالص انجام شد. پروتئین‌ها با استفاده از طیف‌سنج جرمی شناسایی شدند و با آنالیز پروتئوم براساس پاسخ به تنش خشکی در گروه‌های مختلف طبقه‌بندی شدند. به نظر می‌رسد ژنوتیپ همزیست با قارچ اندوفایت با توسعه شبکه ریشه‌ای خود قدرت تأمین آب بیشتری داشته و دیرتر خشکی را درک می‌کند. شاید همزیستی با قارچ به‌نحوی باعث تغییر ساختار بیوشیمی و مورفولوژی گیاه میزبان شده و در نتیجه آستانه تحریک گیاه بالاتر رفته باشد. بیشترین تعداد پروتئین القاشده در ژنوتیپ همزیست با قارچ در طبقه کربن و متابولیسم انرژی قرار داشت. این ژنوتیپ با تنظیم پروتئین‌های مختلف این طبقه فرایندهای مختلف مثل فتوسنتز را پویا و فعال نگه داشت همچنین از قابلیت پروتئین‌های حفاظتی جهت فعال نگه‌داشتن آنزیم‌ها نیز استفاده کرده است.

کلمات کلیدی: اندوفایت، پروتئومیکس، تنش خشکی، گراس، لولیوم

مقدمه

(Clay, 1990; Clay and Schardl, 2002). برخی مطالعات نشان داده است همزیستی با اندوفایت می‌تواند نقش مهمی در پاسخ‌های گراس به تنش‌های زیستی و غیرزیستی داشته باشد (Clay and Schardl, 2002; Marquez et al., 2007; Leuchtmann et al., 2014; Yin et al., 2014; Mirzahossini et al., 2015). خشکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است

تعدادی از گراس‌های علوفه‌ای سردسیری میزبان قارچ‌های اندوفایت هستند. اندوفایت ارگانیسمی است که در فضاها بین سلولی اندام‌های هوایی گیاهان به‌صورت مسالمت‌آمیز زندگی می‌کند و از مواد غذایی تولیدشده توسط گیاه استفاده می‌کند

* نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: lshabani@gmail.com

که رشد و نمو و تولید گیاه را کاهش می‌دهد. یکی از گراس‌های سردسیری که متناوباً در معرض این تنش قرار دارد رای گراس چندساله (*Lolium perenne*) است که تنوع بالایی مورفولوژیکی و ویژگی‌های رشدش شناخته شده است. براساس نظر Yu و همکاران (۲۰۱۳) این گونه نیازمند مقدار زیادی آب است تا رشد خود را حفظ کند و به خشکی سریعاً پاسخ می‌دهد. Norris (۱۹۸۵) و Turgeon (۲۰۰۲) نیز معتقدند رای گراس یک گونه علفی حساس به خشکی است. گونه قارچ *Epichloe festucae var. lolii* عموماً در چچم چند ساله یافت می‌شود و همزیستی به وجود آمده باعث شده این گیاه بهتر بتواند شرایط تنش خشکی را تحمل کرده و در نتیجه آن رشد و تولید بهتر گیاه میزبان را با همراهی فرایندهایی نظیر افزایش محلول‌های سازگار اسمزی، تنظیم بهتر روابط آبی گیاه، کارایی بالاتر دستگاه فتوسنتز، بهبود قابلیت آنتی‌اکسیدانی و در نهایت تنظیم ژنی مناسب در برابر خشکی در مطالعات شاهد هستیم (Dastogeer and Wylie, 2017). این پاسخ در برابر فاکتورهایی مثل نوع نژاد اندوفایت، ژنوتیپ میزبان یا نوع تنش تغییر کرده (Assuero et al., 2006; Crush et al., 2004) و در گزارش‌هایی شواهدی در تأیید بهبود تحمل خشکی به واسطه اندوفایت ارائه نشده است (Hall et al., 2014; Tian et al., 2015; Malinowski et al., 2009). براساس گزارش Ghatak و همکاران (۲۰۱۷) مکانیسم‌هایی که گیاهان در شرایط تنش خشکی اتخاذ می‌کنند دارای چند ویژگی هستند: ۱- فرار از خشکی از طریق کامل کردن سیکل زندگی قبل از اینکه شرایط محیطی دچار تنش شود. ۲- دوری از تنش با کاهش از دست دادن آب از طریق گیاه و افزایش جذب آب ۳- تحمل خشکی با تنظیم اسمزی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی.

زمانی که گیاهان در معرض شرایط تنش خشکی قرار می‌گیرند فیتوهورمون آبسزیک اسید (ABA) سریعاً بوسیله ریشه‌ها تولید می‌شود و به سایر قسمت‌های گیاه انتقال داده می‌شود (Endo et al., 2008). ABA به سلول‌های محافظ منتقل و باعث بسته شدن روزنه‌ها می‌شود و بدین ترتیب تلف شدن آب از طریق برگ‌ها را کاهش می‌دهد (Kanno et

al., 2012) بسته شدن روزنه‌ها باعث کاهش جذب CO₂ نیز می‌شود بنابراین سرعت فتوسنتز کاهش می‌یابد که در نهایت باعث جلوگیری از رشد گیاه می‌شود (Wilkinson and Davies, 2002). کاهش جریان رو به داخل CO₂ در برگ‌ها باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن ROS از طرق مختلف می‌شود. عناصر مضر تولیدشده فعالیت آنزیم‌ها را کاهش می‌دهند و به مولکول‌های زیستی مختلف آسیب می‌زنند (Hao et al., 2015). گیاهان تلاش می‌کنند تا از راه‌های مختلف تولید ROS را کاهش دهند، بنابراین پروتئین‌هایی را که در واکنش‌های فتوسنتزی دخالت دارند مانند زیر واحد کوچک رویسکو و یا آنزیم‌های سیکل کالوین را فروتنظیمی می‌کنند. در شرایط تنش خشکی گیاهان تغییراتی را در بیان ژن‌ها به وجود می‌آورند که منجر به تغییر فرا یا فروتنظیمی در مقدار پروتئین می‌شود. این پروتئین‌ها هومئوستازی متابولیکی را تنظیم می‌کنند و عناصر آسیب‌زا مانند ROS را سم‌زدایی می‌کنند. برای محافظت سلول‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو گیاهان دارای سیستمی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان هستند تا در زمان تنش با فراتنظیمی آنها مقادیر بالای ROS پاک‌روبی شود، شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD) و آسکوربات پراکسیداز (APX) (Marquez et al., 2007; Rosa et al., 2009; Sugawara et al., 2009). یکی از جریان‌های فرودست در پاسخ به افزایش موقتی ABA، تنظیم اسمزی است. اسمولیت‌های تجمع‌یافته شامل پرولین، گلوتامات و قندها هستند که نقش مهمی در حفظ تمامیت غشا و فعالیت آنزیمی در شرایط تنش خشکی دارد (Bhushan et al., 2007). فراتنظیمی پروتئین‌هایی با مکانیسم حفاظتی مانند انواع پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP) مقاومت به تنش را افزایش می‌دهند (Timperio et al., 2008).

پروتئومیکس ابزار قدرتمندی برای شناخت ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش است. از این روش جهت فهم تغییرات کمی و کیفی پروتئین‌های کلیدی مؤثر در مقاومت به تنش استفاده می‌کنند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات تنش خشکی بر الگوی پروتئینی دو ژنوتیپ آلوده به قارچ اندوفایت

و بدون اندوفایت لولیوم و شناسایی پروتئین‌های مؤثر در پاسخ به تنش با استفاده از راهکار پروتئومیکس است. استفاده از این اطلاعات در کنار داده‌های دیگر می‌تواند بستر مناسبی جهت افزایش تحمل خشکی در این گیاه و گیاهان مشابه باشد.

مواد و روش

این تحقیق به صورت یک آزمایش کنترل شده گلدانی در گلخانه پژوهشی دانشگاه شهرکرد در سال‌های ۹۶-۹۷ انجام شد. این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی و آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور ژنوتیپ گیاهی (با حضور و عدم حضور قارچ اندوفایت) و تنش خشکی در دو سطح کنترل و ۸۰٪ تخلیه رطوبت انجام شد. دو ژنوتیپ از گیاه *Lolium prene* انتخاب شد: ژنوتیپ S10 (همزیست با قارچ اندوفایت) و Speedy (بدون قارچ). این ژنوتیپ‌ها از میان تعدادی از ژنوتیپ‌های چچم انتخاب شد که قبلاً روی آنها آزمایش انجام شده بود و از نظر بررسی مقاومت به تنش خشکی مناسب تشخیص داده شده بودند. در مهرماه ۱۳۹۵ ژنوتیپ‌ها به صورت کلون از مزرعه‌ای در منطقه لورک شهرستان نجف‌آباد اصفهان (دارای عرض جغرافیایی ۳۲ درجه و ۳۲ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۲۳ دقیقه شرقی و با ارتفاع حدود ۱۳۶۰ متر از سطح دریا و با بافت خاک لومی-رسی با اسیدیته ۷/۵ و وزن مخصوص ظاهری خاک ۱/۰۴ گرم بر سانتی‌متر مکعب) با میانگین تعداد ۴۰-۲۰ پنجه در هر گلدان به گلخانه پژوهشی دانشگاه شهرکرد انتقال پیدا کردند. گیاهان به مدت ۱ ماه در محیط گلخانه رشد و تکثیر یافتند و برای اطمینان از حضور یا عدم حضور قارچ اندوفایت در ژنوتیپ‌ها از روش Saha و همکاران (۱۹۸۸) استفاده شد. سپس حدود ۲ ماه برای تطبیق با شرایط جدید نور کامل و دمای 24 ± 2 درجه سانتی‌گراد روز و 18 ± 2 درجه سانتی‌گراد شب و رطوبت ۶۰٪-۴۰٪ در گلخانه نگهداری شدند و هفته‌ای دو بار با کود با نام تجاری ۲۰-۲۰-۲۰ با غلظت ۱ گرم در لیتر به خاک گلدان اضافه گردید. بعد از رشد از هر کدام از گلدان‌ها تعداد ۳۰-۲۰ پنجه جدا شده و در ۷ گلدان پلاستیکی با قطر دهانه ۲۰ سانتی‌متر، قطر پائین ۱۶ سانتی‌متر و

عمق ۱۸ سانتی‌متر با حدود ۲ کیلوگرم خاک با $pH=7.78$ و هدایت الکتریکی (۱/۳۴ دسی‌زیمنس بر متر) (به خاک ۲۰ درصد کود پوسیده حیوانی اضافه شد) تکثیر شدند. ۶۰ روز بعد از کاشت، تیمار خشکی با قطع آبیاری شروع شد تا زمانی که تخلیه رطوبتی خاک که بوسیله دستگاه (TDR (Delta-T moisture meter Cambridge-England) اندازه‌گیری شد به حدود ۸۰٪ برسد (۶-۴ روز). در طی این مدت آبیاری گلدان‌های کنترل ادامه داشت. برای اعمال تیمار، گلدان‌ها به صورت تصادفی به دو گروه تقسیم شدند: یک گروه برای تیمار تنش خشکی (قطع آبیاری) و گروه دیگر به عنوان کنترل. زمانی که گلدان‌ها به تخلیه ۸۰٪ رطوبت خود می‌رسیدند با حدود ۵۰۰ میلی‌لیتر آب، آبیاری می‌شدند. ۴ روز بعد از اعمال تیمار خشکی (که در کل یک ماه طول کشید)، نمونه‌برداری از برگ انجام شد و به فریزر ۸۰- انتقال داده شد.

استخراج پروتئین: ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ گیاه با نیتروژن مایع در هاون از پیش سرد شده سائیده شد. سپس به تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتر که حاوی ۱۰٪ TCA w/v و ۰.۰۷ DTT بودند انتقال داده شدند (Yang et al., 2015). عصاره یک شب در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداشته شد. پروتئین‌های ته‌نشین شده در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه برای ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس پلیت حداقل سه مرتبه با استون حاوی ۰.۰۷٪ DTT w/v در ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ دقیقه شسته شد. مخلوط حاصل در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پلیت در دمای اتاق خشک شد و در ۱ میلی‌لیتر بافر نمونه SDS حل شد. محلول به دست آمده به شدت ورتکس شد و در دمای اتاق برای یک ساعت قرار داده شد. سپس در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه برای ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. فاز رویی حاصل به یک تیوب جدید انتقال داده شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب قرار داده شد. مخلوط پروتئینی حاصله در سیستم الکتروفورز SDS-PAGE با حجم مساوی از دو ژل Resolving ۱۰٪ و Stacking ۵٪ انجام شد (Raorane et al.,

بیولوژیکی انجام شد. نتایج کمی پروتئین از نظر آماری توسط student T-test با استفاده از نرم افزار Multi Experiment Viewer (MEV) در سطح $P < 0.05$ انجام شد.

نتایج

دو ژنوتیپ *L. perenne* حدود دو هفته در معرض تیمار خشکی قرار داده شدند. در این مدت فاصله بین آبیاری‌ها براساس تخلیه ۸۰ درصدی رطوبت گلدان‌ها بود. مطالعه موجود نشان داد که شرایط محدودیت آبی باعث تغییرات پروتئوم ژنوتیپ‌ها شده و قابلیت متفاوت دو ژنوتیپ را در پاسخ به شرایط تنش نشان داد (جدول ۱). با آنالیز پروتئومیکس ژنوتیپ‌های S10 و Speedy تعداد ۹۱۵ پروتئین در هر کدام شناسایی شد. پروتئین‌هایی که تحت شرایط تنش آب، مقدارشان تغییر نکرد static proteome نامگذاری شدند. تعداد پروتئین‌های static در دو ژنوتیپ Speedy و S10 به ترتیب ۸۴ و ۷۸۱ بود (شکل ۱). تعداد پروتئین‌هایی که در زمان تنش خشکی تغییر مقدارشان معنی‌دار بود در Speedy و S10 به ترتیب ۴۶۱ و ۹۹ بود. از این تعداد به ترتیب ۲۴ و ۱۴۰ پروتئین تنها در ژنوتیپ‌های S10 و Speedy دیده شدند (شکل ۱ C). پروتئین‌هایی که فقط در شرایط تنش خشکی ظاهر شدند و با نام new مشخص شدند در ژنوتیپ‌های Speedy و S10 به ترتیب ۳۷ و ۸ بودند. تعداد پروتئین‌هایی که در شرایط تنش خشکی ناپدید (Disappear) شدند به ترتیب ۴۱ و ۱۲ بود. تعداد پروتئین‌هایی که تجمع یا افزایش بیان را نشان دادند به ترتیب ۲۴۳ و ۳۱ پروتئین بودند (شکل ۱ A و B). طبقه‌بندی عملکردی براساس درخت سلسله مراتبی bin بوده و بوسیله Mapman ontology و با استفاده از فایل *Brachypodium* mapping تکمیل شده است.

در حالیکه توزیع عملکردی پروتئین‌های شناخته‌شده در شرایط کنترل در دو ژنوتیپ بسیار شبیه یکدیگر بود (شکل ۲ A و B به ترتیب ژنوتیپ‌های S10 و Speedy) ولی تفاوت‌های اساسی بین پروتئین‌ها در زمان تنش خشکی دیده شد (شکل ۲ C و D ژنوتیپ S10 و E و F ژنوتیپ Speedy). حدود ۵۰٪ از

پس از اطمینان از وجود تفاوت در باندهای پروتئینی نمونه‌های تیمار در مقایسه با کنترل، مخلوط پروتئینی هر نمونه در ژل 5% stacking تغلیظ شدند. باندهای منفرد حاصله در ژل stacking که حاوی پروتئین‌های محلول کل خالص و متراکم شده بود با رنگ کوماسی بریلیانت بلو رنگ‌آمیزی شد (Neuhoff et al., 1988) و پس از برش از روی ژل در مرحله بعد استفاده شد.

اسپکترومتري جرمی و آنالیز داده‌ها: باندهای پروتئینی

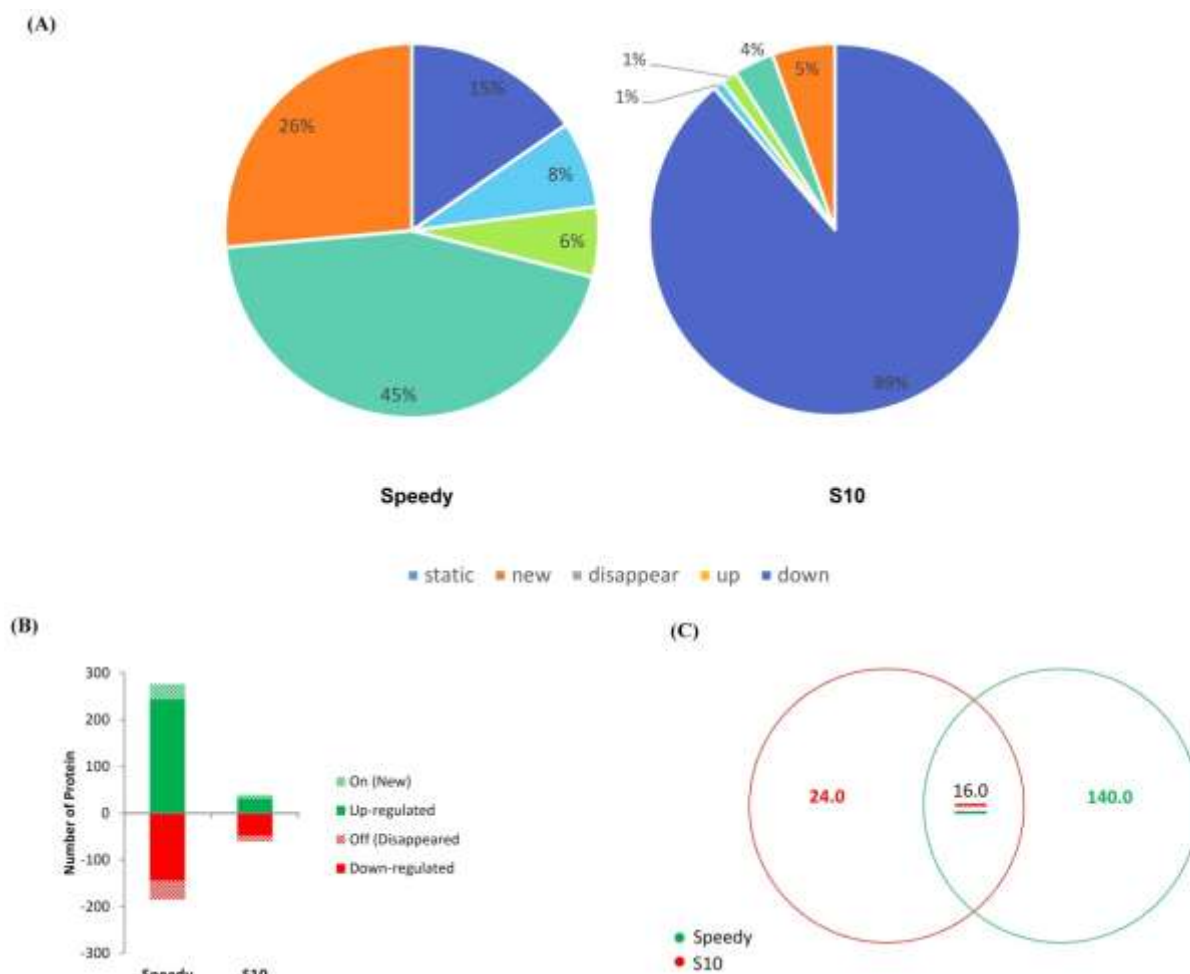
بریده‌شده از روی ژل به قطعات ریز تبدیل شدند و با استفاده از آنزیم تریپسین هضم آنها صورت گرفت. عصاره‌گیری پپتیدها با دستورالعمل (Rappsilber et al., 2007) صورت گرفت. آنالیز LC/MS با استفاده از طیف‌سنج جرمی LTQ Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) جفت‌شده با دستگاه کروماتوگرافی HPLC (Eksigent 2D) (nanoflow) مجهز به ستون C18 حدود ۲۰ سانتی‌متر Reprosil-Pur 120 C-18-AQ, 3 μ m (Dr. Maisch,) (Ammerbuch, Germany) انجام شد.

آنالیز داده‌های خام MS با استفاده از نرم‌افزار Max Quant (v. 1.5.3.30) (Cox and Mann, 2008) در مقابل پایگاه توالی *Brachypodium distachyon* موجود در سایت UniProt انجام شد. میزان کشف اشتباه ۱ درصد برای هر دو لیست پروتئینی و همخوانی پپتیدها اعمال شد. آنالیز گروه‌های پروتئینی با نرم‌افزار Perseus انجام شد (Tyanova et al., 2016). برای آنالیز آماری از آزمون آماری t-test استفاده شد. نسبت‌های نرمال‌شده به صورت $\log_2$ تبدیل شد و میانگین $\log_2$ در هر سه تکرار محاسبه شد. در نهایت، پروتئین‌هایی با p-value کمتر از ۰/۰۵ و سطح بیان به ترتیب بالاتر یا کمتر از ۱/۵ یا ۰/۵ در نظر گرفته شدند.

آنالیز بیوانفورماتیک: داده‌های پروتئومیک در مسیرهای

متابولیسم شمتایک تصویر نمایی شد، همچنین طبقه‌بندی عملکردی پروتئین‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mapman (version 3.6.0 RC1, downloaded from <http://mapman.gabipd.org/webSite>) انجام شد.

آنالیز آماری: آنالیز آماری با دو تکرار تکنیکی و سه تکرار

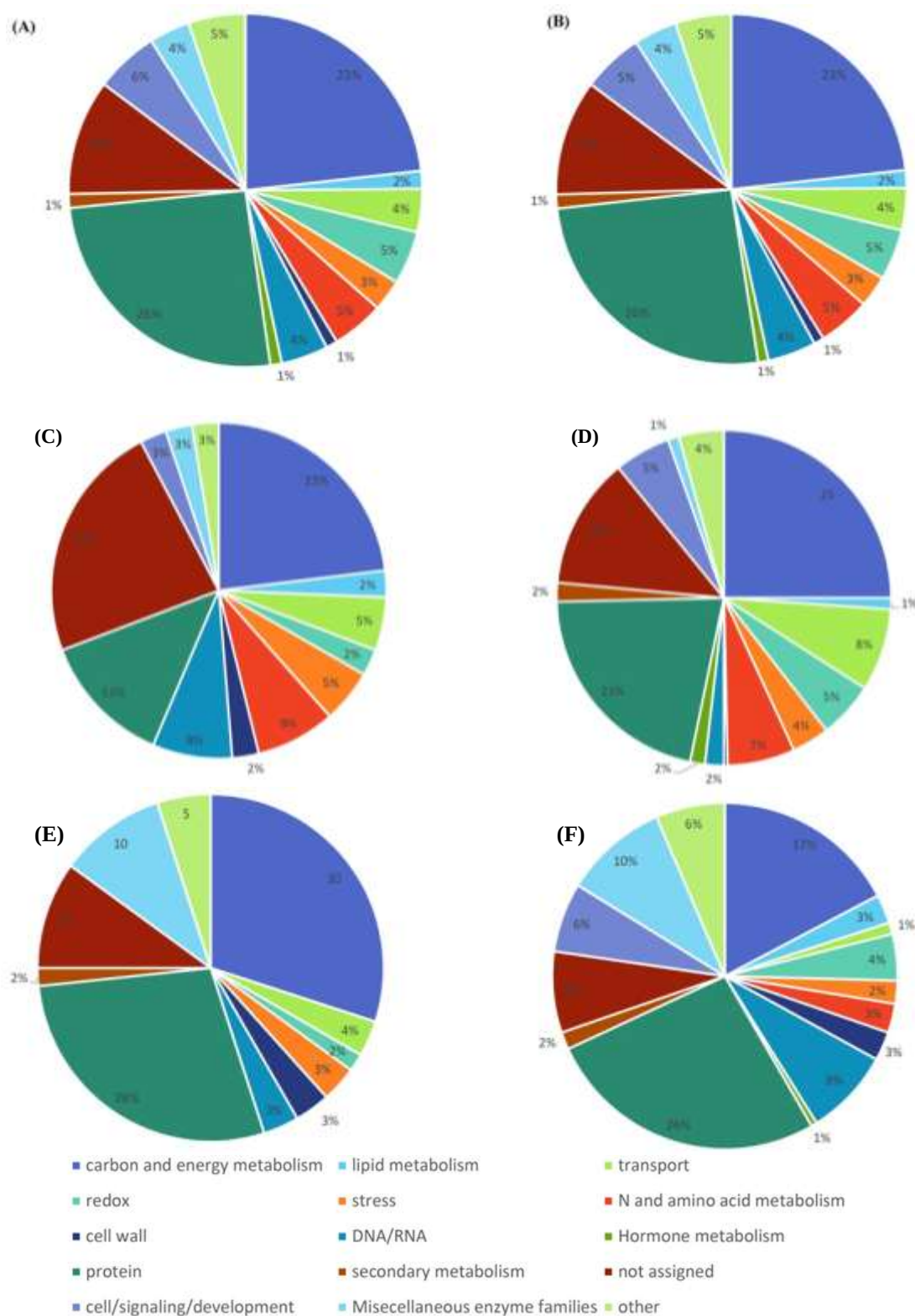


شکل ۱- تغییرات پروتئومیک در پاسخ به تنش آب در ژنوتیپ‌های S10 و Speedy (A). تعداد پروتئین‌های تغییر یافته در دو ژنوتیپ S10 و Speedy در شرایط تنش خشکی (B). دیاگرام پراکنش پروتئین‌های مورد بررسی در دو ژنوتیپ مورد مطالعه در شرایط تنش خشکی (C).

پروتئین‌های شناخته شده در هر ژنوتیپ در مسیرهای متابولیسمی در شکل ۳ و پروتئین‌هایی که در پاسخ‌های تنش دخالت داشتند در شکل ۴ نشان داده شده است.

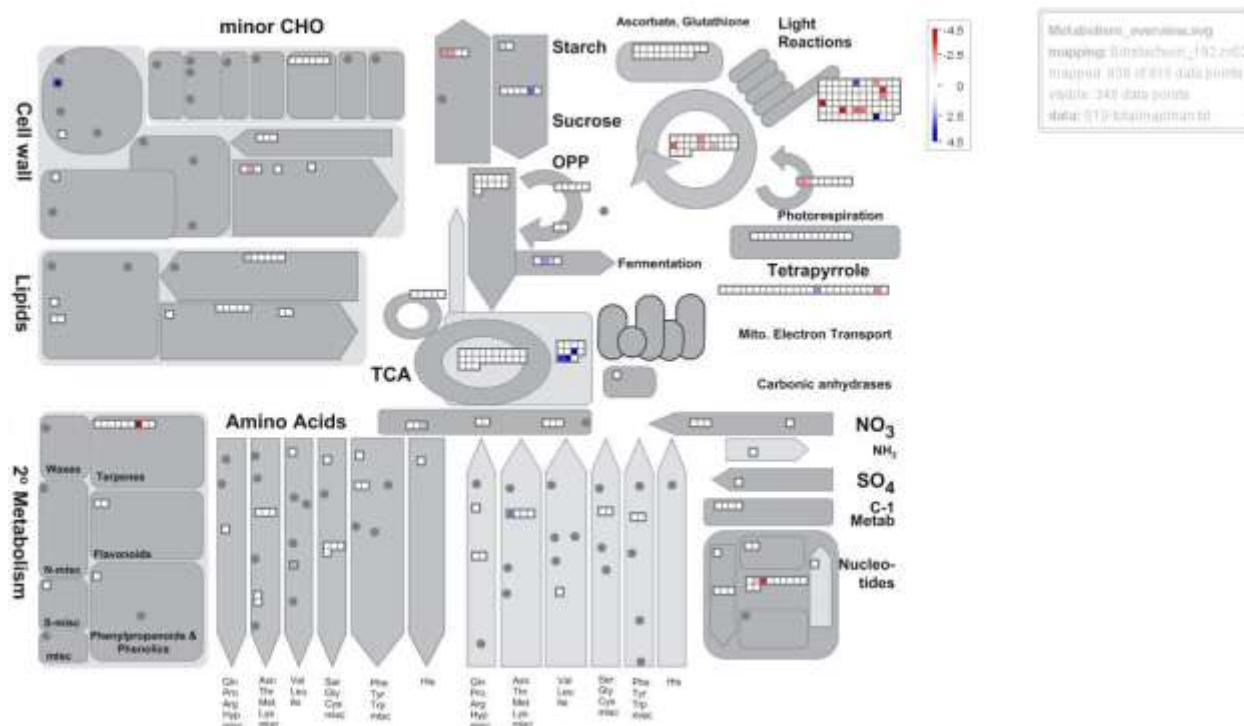
میزان تغییرات القاشده با تنش خشکی در طبقه عملکردی متابولیسم کربن و انرژی بین دو ژنوتیپ متفاوت بود. تغییرات مشاهده شده در فراوانی پروتئین‌ها نشان داد ژنوتیپ Speedy فعال‌سازی بیشتری را در این مسیرها داشته است. در این ژنوتیپ تعداد پروتئین‌های منحصر به فرد ۴۶ عدد بود و بیشتر این پروتئین‌ها درگیر در مسیرهای ETC (زنجیره انتقال الکترون)، TCA (چرخه کربس)، گلیکولیز و CHO Major and minor metabolism بودند. در ژنوتیپ S10 تعداد پروتئین‌های منحصر به فرد کمتر از ژنوتیپ دیگر بود و این

پروتئین‌های حالت کنترل در دو گروه عملکردی قرار گرفتند: ۱- کربن و انرژی متابولیسم ۲- پروتئین (شکل A و B و ۲). تقریباً در همه گروه‌های عملکردی پروتئین‌ها، پروتئین‌هایی بودند که در شرایط تنش تغییرات معنی‌دار داشتند، ولی میزان تغییرات در دو ژنوتیپ متفاوت بود (شکل C و D، E، F و ۲). پروتئین‌هایی که در زمان تنش new بودند و یا مقدارشان افزایش یافته بود تقریباً در همه گروه‌های عملکردی حضور داشتند. البته ژنوتیپ S10 در گروه Hormone و Secondary metabolism پروتئینی که مقدارش افزایش یافته باشد را نشان نداد. آنالیز ماهیت پروتئین‌هایی که بوسیله تنش آب تحت تأثیر قرار گرفتند، تغییرات مسیرهای متابولیسمی و تفاوت‌های بین دو ژنوتیپ را مشخص کرده که برای درک بهتر آن نمای کلی از

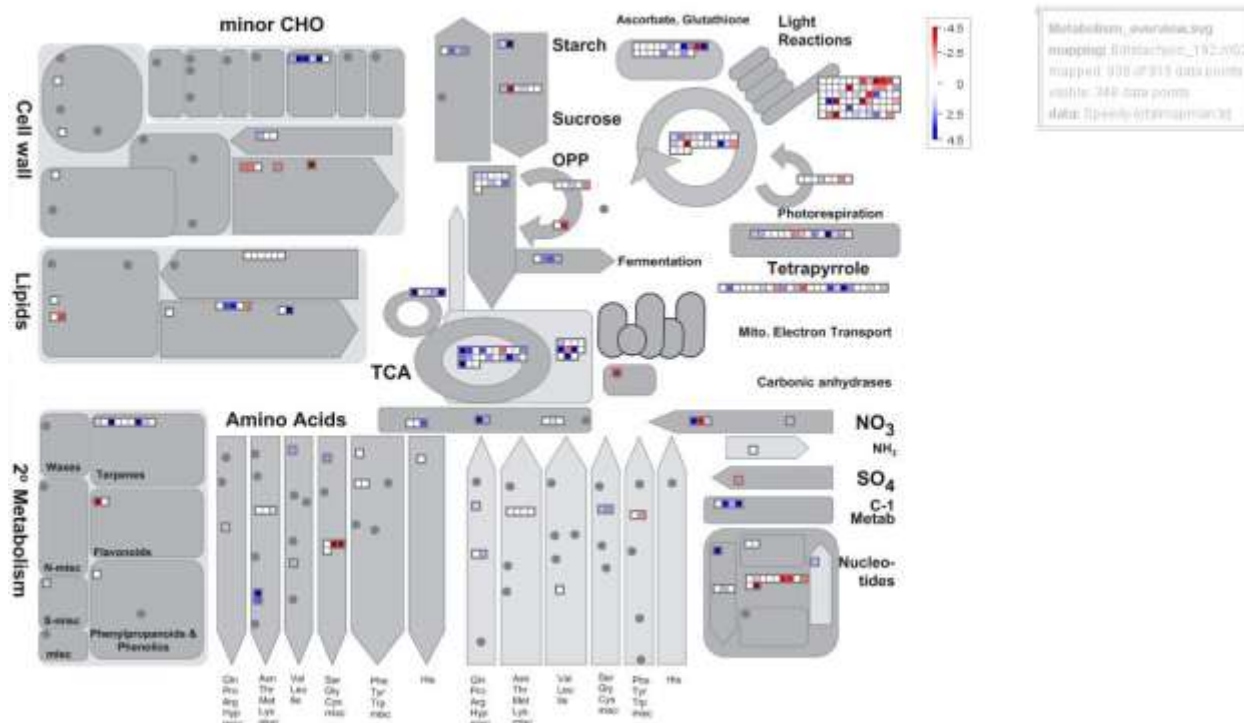


شکل ۲- توزیع عملکردی همه پروتئین‌های شناخته‌شده در ژنوتیپ‌های S10 (A و C، E) و Speedy (B و D، F). (A و B) توزیع همه پروتئین‌های شناخته‌شده در حالت کنترل. C و D پروتئین‌هایی که از نظر مقدار در شرایط تنش افزایش یافتند. E و F پروتئین‌هایی که از نظر مقدار در شرایط تنش آب کاهش یافتند.

(A)

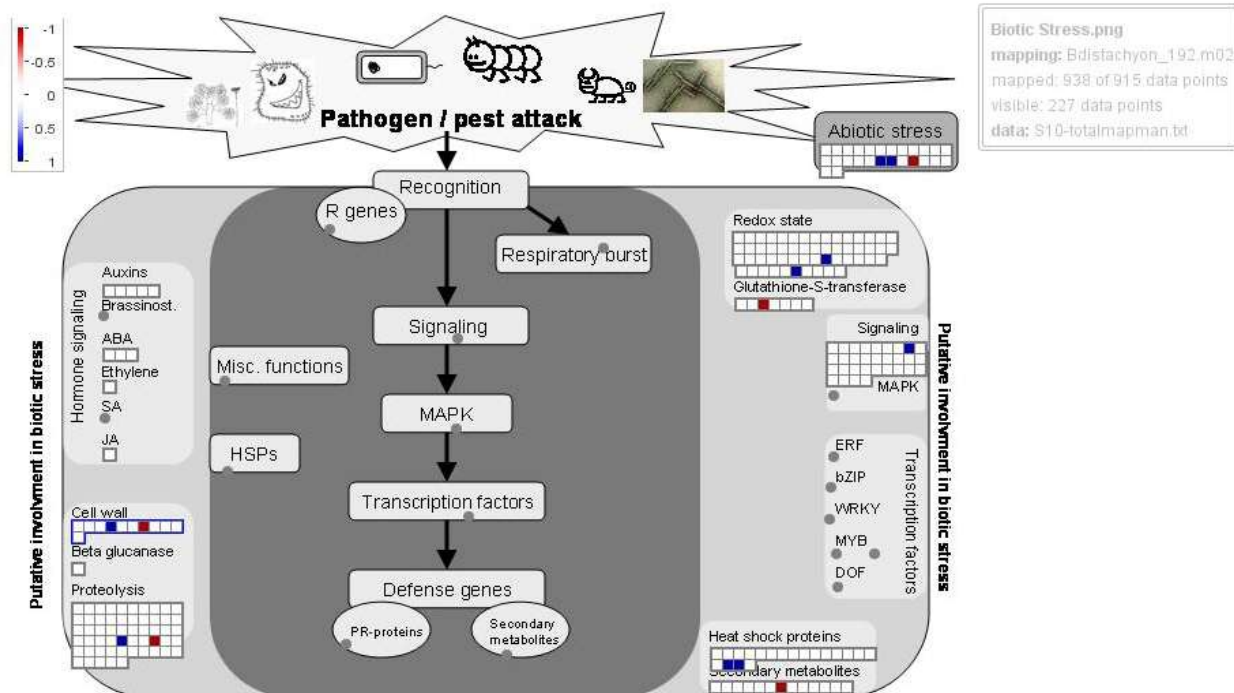


(B)

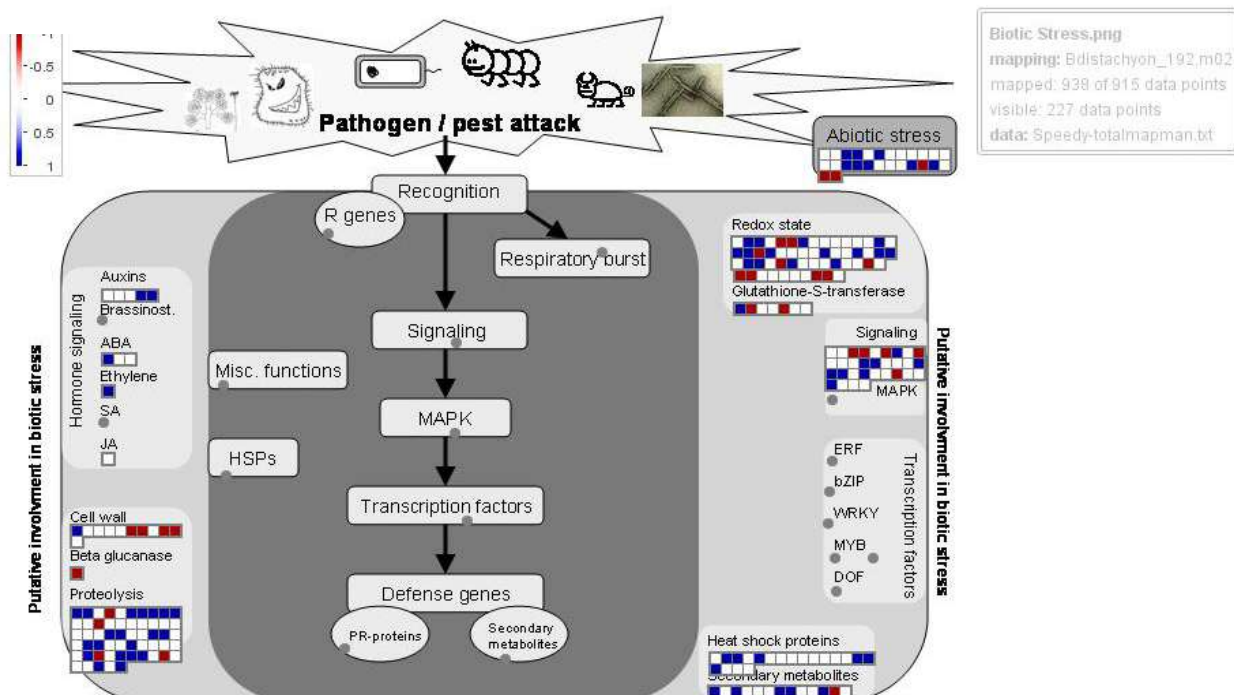


شکل ۳- نمای کلی MAPMAN از مسیرهای متابولیکی در شرایط تنش آب در ژنوتیپ‌های S10 (A) و Speedy (B). نقاط قرمز: کاهش، نقاط سفید: بدون تغییر و نقاط آبی: افزایش در مقدار پروتئین در شرایط تنش آب را در مقایسه با کنترل نشان می‌دهند.

(A)



(B)



شکل ۴- نمای MAPMAN از مسیرهای تنش در شرایط تنش خشکی در ژنوتیپ‌های S10 (A) و Speedy (B). نقاط قرمز: کاهش، نقاط سفید: بدون تغییر و نقاط آبی: افزایش در مقدار پروتئین در شرایط تنش آب را در مقایسه با کنترل نشان می‌دهند.

پروتئین‌ها درگیر واکنش‌های نوری و تاریکی، TCA و ETC بودند. به نظر می‌رسد در پاسخ به تنش خشکی در ژنوتیپ S10

تعداد کمتری از پروتئین‌های مربوط به فتوسنتز، TCA و ETC تغییرات بیانی نشان دادند.

تغییراتی که در فراوانی پروتئین‌ها در طبقه عملکردی lipid metabolism رخ داد بین دو ژنوتیپ متفاوت بود. بیشتر تغییرات در ژنوتیپ Speedy بود. میزان تغییرات کمتری در ژنوتیپ S10 مشاهده شد. تغییراتی که در طی تنش خشکی در طبقه N and amino acid metabolism مشاهده شد نیز بین دو ژنوتیپ متفاوت بود. در این طبقه نیز میزان تغییرات در ژنوتیپ Speedy بیشتر از S10 بود.

در طبقه Secondary metabolism چهار پروتئین منحصر به فرد در ژنوتیپ Speedy دیده شد. ولی هیچ پروتئین منحصر به فردی در ژنوتیپ S10 مشاهده نشد. تنها یک پروتئین در هر دو ژنوتیپ در این طبقه مشترک بود که در ژنوتیپ Speedy القا شده بود ولی در S10 از نظر مقدار کاهش نشان داده بود و آن پروتئین homogentisate farnesyltransferase بود این آنزیم در مسیر بیوسنتز ترپن‌ها است و در بیوسنتز توکوفرول‌ها دخالت دارد.

تغییرات در طبقه Hormone metabolism بین دو ژنوتیپ در پاسخ به تنش خشکی متفاوت بود. در ژنوتیپ Speedy در این طبقه سه پروتئین منحصر به فرد شناسایی شد که دو تای آنها از پروتئین‌های auxin induced-regulated responsive activated بوده که فراتنظیم شدند. سومین پروتئین مربوط به متابولیسم اتیلن بود که این پروتئین نیز فراتنظیم شد. از پروتئین‌هایی که در متابولیسم هورمون ABA دخالت دارند NCDE4 است که در ژنوتیپ Speedy دیده شد. پروتئین دیگر NCDE1 است که در ژنوتیپ Speedy در پاسخ به خشکی از نظر مقدار افزایش یافت. هر دوی این پروتئین‌ها در ژنوتیپ S10 شناسایی نشدند.

تفاوت در تغییرات القاشده در اثر خشکی در طبقه تنش نیز بین دو ژنوتیپ دیده شد. در ژنوتیپ Speedy هفت پروتئین منحصر به فرد بودند که شش مورد از آنها که القا شده بودند پروتئین‌های درگیر در stress abiotic heat بودند. در ژنوتیپ S10 نیز دو مورد پروتئین‌های منحصر به فرد مشاهده شد که

هر دو القا شده بودند. در این گروه تعداد پنج پروتئین در ژنوتیپ Speedy در پاسخ به خشکی تغییر کردند. سه مورد از آنها در این دو ژنوتیپ down/disappear شده است. مثلاً germin-like-proteins (GLP) در ژنوتیپ Speedy فروتنظیمی را نشان داد، اما در ژنوتیپ S10 تغییری مشاهده نشد. دو پروتئین protein leucine Rich-Repeat family و universal stress protein (USP) در هر دو ژنوتیپ در پاسخ به خشکی تغییر کردند اما تغییرات آنها در ژنوتیپ Speedy فراتنظیم و در ژنوتیپ S10 فروتنظیم شدند.

در طبقه پروتئین‌های Redox نیز در پاسخ به خشکی تغییراتی دیده شد. در ژنوتیپ Speedy هشت پروتئین منحصر به فرد دیده شد که پنجاه درصد آنها در پاسخ به خشکی فراتنظیم شدند. هیچ گونه پروتئین redox منحصر به فردی در ژنوتیپ S10 مشاهده نشد. آنزیم تیوردکسین ردوکتاز تنها فصل مشترک بین دو ژنوتیپ بود. ولی این آنزیم در ژنوتیپ Speedy از نظر مقدار افزایش را نشان داد ولی در ژنوتیپ S10 در پاسخ به خشکی ناپدید شد.

تفاوت در تغییرات القاشده در طبقه protein نیز بین دو ژنوتیپ مشاهده شد. در ژنوتیپ Speedy در این طبقه مجموعاً سی و هفت پروتئین منحصر به فرد شناسایی شد. از بین اینها بیست و هفت پروتئین فراتنظیمی شده بودند. در ژنوتیپ S10 مجموعاً هفت پروتئین منحصر به فرد در پاسخ به تنش خشکی مشاهده شده که در مقایسه با ژنوتیپ دیگر کمتر بود.

بحث

مطالعات زیادی در گیاهان مختلف در رابطه با مکانیسم‌های حساس به خشکی صورت گرفته است ولی هنوز بخش بزرگی از مکانیسم‌های مقاومت ناشناخته است. مقاومت به خشکی یک صفت پیچیده پلی‌ژنیک است بنابراین شناسایی پروتئین‌های مسئول مقاومت و نقش آنها در این مکانیزم دارای اهمیت است.

همکاری بین گراس و قارچ اندوفایت به‌عنوان یک همزیستی مسالمت‌آمیز شناخته شده است. در تحقیقات

مختلف این گونه بیان شده است که گیاهانی که آلوده به قارچ‌های اندوفایت شده‌اند در مقایسه با گیاهان بدون قارچ اندوفایت در مقابله با تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارای برتری‌هایی هستند مثل مقاومت به تنش خشکی، افزایش قدرت رقابت و مقاومت در برابر بیماری‌ها (Xu et al., 2017). در این مطالعه با مقایسه پروتئومیکس، وقایع مولکولی دو ژنوتیپ چچم چند ساله (S10 دارای قارچ اندوفایت، و ژنوتیپ بدون قارچ Speedy) در پاسخ به تنش خشکی بررسی شد. یافته‌های حاصل از این گونه مطالعات می‌تواند در بهبود استراتژی‌های تحمل خشکی در گیاهان کمک‌کننده باشد و دانش ما را در مورد مکانیسم‌های مولکولی درگیر در پاسخ به خشکی افزایش دهد. نتایج مرتبط با گروه‌های عملکردی مورد مطالعه: lipid, Cell wall, carbon and energy metabolism, secondary metabolism, N and amino acid metabolism, Redox, stress, Hormone metabolism, Protein, DNA/RNA، می‌تواند نشان دهد که چگونه همزیستی قارچ با چچم توانسته است بر تحمل گیاه در تنش خشکی اثرگذار باشد.

مقایسه تعداد آنزیم‌های درگیر در تنش خشکی طبقه carbon and energy metabolism نشان می‌دهد در ژنوتیپ Speedy در مقایسه با ژنوتیپ S10 تعداد بیشتری از آنزیم‌ها تغییر کرده‌اند. علی‌رغم زیاده‌بودن تعداد پروتئین‌های درگیر در واکنش‌های نوری در این ژنوتیپ به‌نظر می‌رسد تولید مواد فتوسنتزی در ژنوتیپ بدون قارچ کاهش یافته است. ممانعت فتوسنتز به‌دلیل بسته‌شدن روزنه‌ها یکی از اثرات مخرب تنش خشکی است. بنابراین به‌دنبال آن بایستی شاهد کاهش کلی در پروتئین‌های مربوط به فتوسنتز نیز بود (Patro et al., 2014). در این آزمایش نیز فروتنظیمی تعدادی از پروتئین‌های درگیر در فتوسنتز مانند sedoheptulose-bisphosphatase و Fructose-bisphosphate aldolase مشاهده شد. در مقابل تعدادی از پروتئین‌های درگیر در فتوسنتز نیز افزایش نشان دادند. این افزایش می‌تواند بازخوردی در پاسخ به کاهش مقدار آنزیم‌ها باشد. کاهش آنزیم‌های فتوسنتزی می‌تواند برای

جلوگیری از تولید ROS در کلروپلاست‌ها باشد (Farah et al., 2002; Chaves et al., 2012). تغییرات مشاهده‌شده در فراوانی پروتئین‌ها نشان داد ژنوتیپ Speedy فعال‌سازی بیشتری را در مسیر متابولیسم کربن و انرژی داشت. مقابله با تنش خشکی یک فرآیند هزینه‌بر است (Echevarria-Zomeno et al., 2009). در این مطالعه در هر دو ژنوتیپ تمایل به افزایش آنزیم‌های درگیر در تجزیه نشاسته و سوکروز مشاهده شد. آنزیم‌های مسیر تجزیه نشاسته Glucan water dikinase و starch phosphorylase در هر دو ژنوتیپ از نظر مقدار افزایش نشان دادند. در مقابل ایزوفرم‌های آنزیم‌های مسیر سنتز نشاسته در ژنوتیپ Speedy فراتنظیمی از خود نشان دادند. در ژنوتیپ S10 در برخی ایزوفرم‌ها تغییری مشاهده نشد و در برخی دیگر فروتنظیمی مشاهده شد. فراتنظیمی این آنزیم‌ها می‌تواند پاسخی فیدبکی به کاهش مقدار نشاسته در گیاه باشد. بنابراین از یک طرف گیاه برای مقابله با این تنش نیاز به انرژی دارد، و از طرف دیگر میزان فتوسنتز نیز در گیاه کاهش یافته است در این جا گیاه برای تأمین انرژی مورد نیاز مسیرهای مختلفی که در مقابله با تنش فعال کرده است، شروع به تجزیه نشاسته می‌کند. افزایش تجزیه نشاسته و کاهش مقدار آن می‌تواند به‌صورت بازخورد روی آنزیم‌های مسیر سنتز نشاسته تأثیر گذاشته و باعث فراتنظیمی آنها شود. حدود ۲۰٪ از کل پروتئین‌هایی که به خشکی حساس هستند در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و انرژی مثل گلیکولیز، TCA، ETC و سنتز ATP دخالت دارند (Wang et al., 2014). آنزیم‌های مختلف این مسیرها بسته به شدت و طول مدت تنش و توانایی گیاه در تحمل خشکی در برخی مطالعات فروتنظیمی و در برخی دیگر فراتنظیمی از خود نشان داده‌اند. فروتنظیمی می‌تواند مکانیسمی برای تجمع قندها به‌عنوان اسمولیت یا منبع انرژی برای زمان بازگشت از بازیابی باشد. در حالیکه فراتنظیمی آنزیم‌ها یک استراتژی برای تهیه انرژی در زمان فعال‌شدن سیستم دفاعی در برابر تنش است (Echevarria-Zomeno et al., 2009).

با توجه به نتایج مرتبط با طبقه Cell wall که در این آزمایش دیده شد این ژنوتیپ‌ها برای مقابله در برابر تنش

پرولین و در نتیجه آن توانایی تنظیم اسمزی سلول‌ها در زمان تنش خشکی شود (Cheng et al., 2016). به نظر می‌رسد فراتنظیمی مشاهده‌شده و بیوسنتز پرولین استراتژی این ژنوتیپ در برابر خشکی باشد. بعد از مواجهه گیاه با تنش خشکی و تولید فیتوهورمون ABA یکی از پاسخ‌های پائین‌دست این هورمون تنظیم اسمولیت‌هایی مانند پرولین است. یکی از آنزیم‌های کلیدی بیوسنتز این آمینواسید 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase است که در ژنوتیپ Speedy افزایش یافت.

تفاوت بین ژنوتیپ‌های دارای قارچ و بدون قارچ در میان پروتئین‌های طبقه secondary metabolism قابل رؤیت بود. در ژنوتیپ بدون قارچ در پاسخ به تنش خشکی تعداد آنزیم بیشتری از این مسیر فعال شده بود. تجمع متابولیت‌های ثانویه به‌عنوان نشانه‌ای از فعال‌شدن یک مکانیسم دفاعی در گیاهان است و به نظر می‌رسد برای تطابق سلول در برابر تنش مهم باشد. آنزیم‌هایی که در Speedy تغییرات معنی‌دار نشان دادند در متابولیسم ترین‌ها و فلاونوئیدها دخالت داشتند. در ژنوتیپ S10 تنها بیان یک آنزیم از مسیر ترین‌ها ممانعت‌شده که آنزیم Homogentisate farnesyltransferase بود. در حالیکه این آنزیم در ژنوتیپ Speedy افزایش یافت. این آنزیم در مسیر بیوسنتز توکوفرول‌ها دخالت دارد.

در مطالعات مختلفی که روی ژنوتیپ‌های گیاهی مقاوم و حساس به خشکی انجام شده مشخص شده است که ژن‌های مختلفی برای حفاظت از گیاه در برابر تنش خشکی فعال می‌شوند. این ژن‌ها می‌توانند در پاسخ به هورمون ABA تغییر کرده باشند (Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki, 2009). فیتوهورمون آبسزیک اسید نقشی کلیدی در تطابق با شرایط محیطی نامناسب مثل خشکی ایفا می‌کند. در این مطالعه مشاهده شد تعداد کمی از پروتئین‌هایی که در شرایط تنش خشکی از نظر مقدار تغییر کردند متعلق به طبقه عملکردی متابولیسم هورمون بودند. در این مطالعه مشاهده شد NCED1 آنزیم کلیدی در بیوسنتز ABA در ژنوتیپ Speedy افزایش یافته است. در ژنوتیپ دارای قارچ در این طبقه هیچ پروتئینی

خشکی بخش عمده تغییراتی را که در مقدار پروتئین‌ها اعمال کرده‌اند بیشتر از نوع کاهشی بوده است. فروتنظیمی این پروتئین‌ها می‌تواند نشان دهد که این ژنوتیپ‌ها با محدودکردن رشد به تنش خشکی پاسخ داده‌اند تا شاید راهی برای ذخیره انرژی آنها باشد و ذخایر کربوهیدراتی خود را حفظ کنند و بدین وسیله گیاه در شرایط تنش بقا یابد. با توجه به مشاهدات در طی این تحقیق استحکام و ضخامت بیشتر برگ در ژنوتیپ S10 در مقایسه با ژنوتیپ دیگر مشهود بود. به نظر می‌رسد یکی از واکنش‌هایی که این ژنوتیپ به تنش خشکی داشته افزایش سنتز دیواره سلولی باشد. افزایش سنتز دیواره سلولی در شرایط تنش خشکی احتمالاً با افزایش قدرت مکانیکی، می‌تواند به‌عنوان استراتژی باشد که میزان از دست‌دادن آب و دهیدراتاسیون سلول را کاهش دهد (Skirycz and Inze, 2010).

در میان پروتئین‌هایی که در متابولیسم لیپید دخالت دارند می‌توان به پروتئین‌های فسفولیپاز و فسفولیپاز D اشاره کرد که در شرایط تنش خشکی اعمال‌شده در ژنوتیپ Speedy فراتنظیمی نشان دادند. تعداد آنزیم‌های فروتنظیم‌شده نسبت به آنزیم‌های فراتنظیم‌شده در این ژنوتیپ بیشتر بود. بنابراین به نظر می‌رسد در مقاومت به خشکی متابولیسم لیپیدها نقش چندانی در گیاه نداشته باشد. در ژنوتیپ S10 هیچ گونه فروتنظیمی در آنزیم‌های این طبقه مشاهده نشد و تنها یک آنزیم افزایش داشت که مربوط به سنتز اسیدهای چرب بود.

در مطالعات و تحقیقات مختلف نشان داده شده است که تنش خشکی مقدار آمینواسیدهای آزاد را در سلول‌های گیاهی تغییر می‌دهد (Pandey et al., 2012). این تغییر می‌تواند به دلیل افزایش تجزیه پروتئین‌ها و یا به‌واسطه تنش برخی از آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز آمینواسیدها در طی تنش فراتنظیم شده‌اند (Guo et al., 2008; Gadaleta et al., 2011). با توجه به نتایج به‌دست آمده فراتنظیمی در پروتئین‌های درگیر در متابولیسم آمینواسیدهای آسپاراژین، متیونین، تره‌آونین، پرولین، گلوتامین و آرژنین می‌توان در ژنوتیپ Speedy مشاهده شد. فراتنظیمی ایزوفرم پلاستیدی گلوتامین سنتتاز می‌تواند باعث تجمع

فراتنظیم و یا فروتنظیم نشد و تغییری را نشان نداد.

در طبقه عملکردی "تنش" نیز تأثیر همزیستی بین قارچ و گیاه در میزان تغییرات پروتئین‌ها آشکار بود و ژنوتیپ S10 در مقایسه با ژنوتیپ بدون قارچ کمتر تحت تأثیر قرار گرفته بود. شاید این دلیل تفاوت در پاسخ که در همه طبقات پروتئینی دیده شد مربوط به تغییر بیوشیمی و یا مورفولوژی میزبان به واسطه همزیستی با قارچ اندوفایت باشد. یکی از پروتئین‌هایی که در این طبقه در ژنوتیپ Speedy فروتنظیمی نشان داد 3-like protein 3-14 بود. ولی در ژنوتیپ دارای قارچ تغییری نکرد. این پروتئین یکی از پروتئین‌های حساس به خشکی است که میزان بیان آن از نظر مقدار در برخی از گیاهان در پاسخ به خشکی کاهش یافته است (Ghabooli et al., 2013). این پروتئین نقش کلیدی در تعدادی از فرایندهای بیولوژیکی شامل سیگنالینگ، فرایندهای پاسخ‌دهنده به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، فعال‌سازی نسخه‌برداری و یا دفاع دارند (Chen et al., 2006).

یکی از تفاوت‌هایی که در آنالیز پروتئومیکس گیاهان در حالت کنترل و تنش آب دیده می‌شود فراتنظیمی پروتئین‌های HSP است. HSPs یکی از گروه‌های دخالت‌کننده در متابولیسم پروتئین‌ها هستند. در مورد عملکرد HSPs در تحمل خشکی بسیار بحث شده است (Timperio et al., 2008). ولی دیده شده است انتقال ژن‌های HSP به Arabidopsis باعث تحمل خشکی می‌شود (Masand and Yadav, 2016). تنش‌های غیرزیستی باعث از بین رفتن عملکرد پروتئین می‌شوند. HSPs برای کنترل کیفیت و حفظ عملکرد پروتئین، فولدینگ مناسب پروتئین، جابجایی و تجزیه پروتئین‌ها مورد نیاز هستند. این پروتئین‌ها در حفاظت گیاهان برابر تنش‌های غیرزیستی مختلف و استقرار دوباره همئوستازی سلولی نقش دارند (Jedmowski et al., 2014). در ژنوتیپ دارای قارچ فراتنظیمی heat shock protein و heat shock family protein دیده شد. در ژنوتیپ بدون قارچ Speedy نیز فراتنظیمی انواع مختلفی از HSPs مشاهده گردید.

آنالیز پروتئومیکس تفاوت‌هایی بین دو ژنوتیپ در

خصوص آنزیم‌هایی که در متابولیسم ردوکس دخالت دارند را نشان داد. در شرایط تنش خشکی، همئوستازی ردوکس سلولی مهم است. چون در این وضعیت ROS تولید می‌شود. تجمع ROS در غلظت‌های بالا خطرناک است بنابراین گیاهان آنزیم‌های پاکروبی‌کننده را افزایش می‌دهند (Rosa et al., 2009). در این طبقه آنزیمی تعداد آنزیم‌های فعال‌شده در اثر تنش خشکی بیشتر از تعداد آنزیم‌های فروتنظیمی شده بود. در ژنوتیپ بدون قارچ نه پروتئین از نظر مقدار افزایش نشان دادند. آنالیز پروتئومیکس تفاوت‌هایی را در آنزیم‌های مربوط به متابولیسم ردوکس در بین این دو ژنوتیپ نشان داد. چهار آنزیم فراتنظیم‌شده منحصر به فرد در ژنوتیپ Speedy دیده شد. در ژنوتیپ S10 فراتنظیمی آنزیم منحصر به فردی دیده نشد. با اینکه آنزیم تیوردکسین ردکتاز در ژنوتیپ بدون قارچ فراتنظیمی شد ولی در ژنوتیپ دارای قارچ فروتنظیم شد. آنزیم superoxide dismutase (Cu-Zn) در ژنوتیپ S10 فراتنظیم شد. به نظر می‌رسد ژنوتیپ‌های بدون قارچ از این مکانیسم مؤثرتر از ژنوتیپ دارای قارچ استفاده می‌کنند و آنزیم‌های پاکروب‌کننده بیشتری را به کار می‌گیرند. احتمالاً میزان ROS تولیدشده در ژنوتیپ بدون قارچ بیشتر از ژنوتیپ دارای قارچ بوده و بنابراین برای حفظ همئوستازی سلولی خود تعداد آنزیم بیشتری را فعال کرده‌اند.

اگر چه توزیع عملکردی پروتئین‌های شناسایی‌شده در حالت کنترل در دو ژنوتیپ مشابه بود ولی تفاوت‌های آشکاری در میان نتایج آنالیز پروتئومیکس ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش خشکی دیده شد. آنالیز پروتئومیکس نشان داد که در شرایط تنش خشکی در دو ژنوتیپ فراوانی برخی پروتئین‌ها که در بیوستز دیواره سلولی، متابولیسم کربن و انرژی و یا در متابولیسم آمینواسیدها و غیره دخالت دارند تغییر می‌کند. به‌طور کلی براساس آنچه در این آزمایش مشاهده شد شرایط بهتر تحمل تنش در ژنوتیپ دارای قارچ مشهود بود.

نتیجه‌گیری

در زمان تنش خشکی فستوز ممانعت می‌شود که به‌نظر

ABA در آنها فعال نبوده ولی ژنوتیپ بدون قارچ تنش شدیدتری را درک کرده و به نظر می‌رسد با فراتنظیمی بیشتر پروتئین‌های طبقه stress scavenging enzyme به آن پاسخ دادند. در مقابل ژنوتیپ دارای قارچ از پروتئین‌های HSP بیشتری کمک گرفته تا ساختار فعال پروتئین‌هایش حفظ شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب پایان‌نامه دانشجویی و با حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهرکرد انجام پذیرفته است، و بدین وسیله از گونت با شماره 95GRN1M1032 قدردانی می‌گردد.

می‌رسد این ممانعت در ژنوتیپ بدون قارچ آشکارتر بوده و بنابراین این گراس‌ها برای تأمین هزینه انرژی خود مسیرهای تجزیه‌ای را فعال کردند و رشدشان کاهش یافته است. نتایج مورفولوژیک (که در اینجا آورده نشده است) این تحقیق نشان داد که ژنوتیپ دارای قارچ تحت تنش خشکی دارای برگ‌های ضخیم‌تری در مقایسه با ژنوتیپ دیگر بود. یکی از استراتژی‌های مورد کاربرد ژنوتیپ بدون قارچ تجمع اسمولیت‌هایی نظیر پرولین بود. همچنین تحریک مسیر سنتز ترپن‌ها نیز در این ژنوتیپ تا حدی کمک‌کننده بود. با توجه به اینکه ژنوتیپ دارای قارچ در مقایسه با همتهای بدون قارچ اندوفایت ریشه توسعه‌یافته‌تری دارند بهتر می‌تواند آب را از بخش‌های عمقی‌تر خاک جذب کند و دیده شد مسیر سنتز

منابع

- Assuero, S. G., Tognetti, J. A., Colabelli, M. R., Agnusdei, M. G., Petroni, E. C. and Posse, M. A. (2006) Endophyte infection accelerates morpho- physiological responses to water deficit in tall fescue. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 49: 359-370.
- Bhushan, D., Pandey, A., Choudhary, M. K., Datta, A., Chakraborty, S. and Chakraborty, N. (2007) Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in chickpea extracellular matrix during dehydration stress. *Molecular and Cellular Proteomics* 6: 1868-1884.
- Chaves, M. M., Pereira, J. S., Maroco, J., Rodrigues, M. L., Ricardo, C. P. P., Osorio, M. L. and Pinheiro, C. (2002) How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of Botany* 89: 907-916.
- Chen, F., Li, Q., Sun, L. and He, Z. (2006) The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress. *DNA Research* 13: 53-63.
- Cheng, L., Wang, Y., He, Q., Li, H., Zhang, X. and Zhang, F. (2016) Comparative proteomics illustrates the complexity of drought resistance mechanisms in two wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars under dehydration and rehydration. *BMC Plant Biology* 16: 188.
- Clay, K. (1990) Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 275-297.
- Clay, K. and Schardl, C. (2002) Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist* 160: S99-S127.
- Crush, J. R., Popay, A. J. and Waller, J. (2004) Effect of different Neotyphodium endophytes on root distribution of a perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivar. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 47: 345-9.
- Cox, J. and Mann, M. (2008) Maxquant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology* 26: 1367-1372.
- Dastogeer, K. M. and Wylie, S. J. (2017) Plant-fungi association: Role of fungal endophytes in improving plant tolerance to water stress. In: *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives* (eds. Singh, D.P. *et al.*) Pp. 143-159. Springer, Singapore.
- Echevarria-Zomeno, S., Ariza, D., Jorge, I., Lenz, C., del Campo, A., Jorin, J. V. and Navarro, R. M. (2009) Changes in the protein profile of *Quercus ilex* leaves in response to drought stress and recovery. *Journal of Plant Physiology* 166: 233-245.
- Endo, A., Sawada, Y., Takahashi, H., Okamoto, M., Ikegami, K., Koiwai, H. and Nakazono, M. (2008) Drought induction of Arabidopsis 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. *Plant Physiology* 147: 1984-1993.
- Farah, D., Ashurosh, K. P., Sanjay, R., Ashwarya, M., Ruchi, S., Sharma, Y. K., Pramod, A. S. and Vivek, P. (2012) Physiological and proteomic responses of cotton (*Gossypium herbaceum* L.) to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 53: 6-18.
- Ghabooli, M., Khatabi, B., Ahmadi, F. S., Sepehri, M., Mirzaei, M., Amirkhani, A. and Salekdeh, G. H. (2013) Proteomics study reveals the molecular mechanisms underlying water stress tolerance induced by *Piriformospora*

- indica* in barley. Journal of Proteomics 94: 289-301.
- Gadaleta, A., Nigro, D., Giancaspro, A. and Blanco, A. (2011) The glutamine synthetase (GS2) genes in relation to grain protein content of durum wheat. Functional and Integrative Genomics 11: 665-670.
- Ghatak, A., Chaturvedi, P., Paul, P., Agrawal, G. K., Rakwal, R., Kim, S. T. and Gupta, R. (2017) Proteomics survey of Solanaceae family: current status and challenges ahead. Journal of Proteomics 169: 41-57.
- Guo, Q. F., Zhang, J., Gao, Q., Xing, S. C., Li, F. and Wang, W. (2008) Drought tolerance through overexpression of monoubiquitin in transgenic tobacco. Journal of Plant Physiology 165: 1745-1755.
- Hall, S. L., McCulley, R. L., Barney, R. J. and Phillips, T. D. (2014) Does fungal endophyte infection improve tall fescue's growth response to fire and water limitation? Public Library of Science 9: e86904
- Hao, P., Zhu, J., Gu, A., Lv, D., Ge, P., Chen, G. and Yan, Y. (2015) An integrative proteome analysis of different seedling organs in tolerant and sensitive wheat cultivars under drought stress and recovery. Proteomics 15: 1544-1563.
- Jedrowski, C., Ashoub, A., Beckhaus, T., Berberich, T., Karas, M. and Bruggemann, W. (2014) Comparative analysis of sorghum bicolor proteome in response to drought stress and following recovery. International Journal of Proteomics 2014: 1-10.
- Kanno, Y., Hanada, A., Chiba, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Matsui, M. and Seo, M. (2012) Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. Proceedings of the National Academy of Sciences 109: 9653-9658.
- Leuchtmann, A., Bacon, C. W., Schardl, C. L., White, J. F. and Tadych, M. (2014) Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloe*. Mycologia 106: 202-215.
- Malinowski, D. P., Kigel, J. and Pinchak, W. (2009) Water deficit, heat tolerance, and persistence of summer-dormant grasses in the US Southern Plains. Crop Science 49: 2363-2370.
- Marquez, S. S., Bills, G. F. and Zabalgoitia, I. (2007) The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. Fungal Diversity 27: 171-195.
- Masand, S. and Yadav, S. K. (2016) Overexpression of MuHSP70 gene from *Macrotyloma uniflorum* confers multiple abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. Molecular Biology Reports 43: 53-64.
- Mirzakhosini, Z., Shabani, L., Sabzalain, M. R. and Sharifi-Tehrani, M. (2015) ABC transporter and metallothionein expression affected by NI and *Epichloe* endophyte infection in tall fescue. Ecotoxicology and Environmental Safety 120: 13-19.
- Nakashima, K., Ito, Y. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. Plant Physiology 149: 88-95.
- Neuhoff, V., Arold, N. and Taube, D. E. W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis 9: 255-62.
- Norris, I. (1985) Relationships between growth and measured weather factors among contrasting varieties of Lolium, Dactylis and Festuca species. Grass and Forage Science 40: 151-159.
- Pandey, S., Rai, R. and Rai, L. C. (2012) Proteomics combines morphological, physiological and biochemical attributes to unravel the survival strategy of *Anabaena* sp. PCC7120 under arsenic stress. Journal of Proteomics 75: 921-37.
- Patro, L., Mohapatra, P. K., Biswal, U. C. and Biswal, B. (2014) Dehydration induced loss of photosynthesis in Arabidopsis leaves during senescence is accompanied by the reversible enhancement in the activity of cell wall beta-glucosidase. Journal of Photochemistry and Photobiology 137: 49-54.
- Raorane, M. L., Narciso, J. O. and Kohli, A. (2016) Total soluble protein extraction for improved proteomic analysis of transgenic rice plant roots. Methods in Molecular Biology 1385: 139-147.
- Rappsilber, J., Mann, M. and Ishihama, Y. (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using Stage Tips. Nature Protocols 2: 1896-906.
- Rosa, L. H., Vaz, A. B. M., Caligorne, R. B., Campolina, S. and Rosa, C. A. (2009) Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). Polar Biology 32: 161-167.
- Saha, D. C., Jackson, M. A. and Johnson-Cicalese, J. M. (1988) A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grasses. Phytopathology 78: 237-239.
- Skirycz, A. and Inze, D. (2010) More from less: Plant growth under limited water. Current Opinion in Biotechnology 21: 197-203.
- Sugawara, K., Hesse, U., Liu, J., Goodin, M. M., Barnes, A., Dinkins, R. D. and Schardl, C. L. (2009) The grass symbiont, *Epichloe festucae*, visualized in endophytic and pathogenic states by GFP expression with epifluorescence and confocal microscopy. Phytopathology 99: S126.
- Tian, Z., Huang, B. and Belanger, F. C. (2015) Effects of *Epichloe festucae* fungal endophyte infection on drought and heat stress responses of strong creeping Red Fescue. Journal of the American Society for Horticultural Science 140: 257-264.
- Timperio, A. M., Egidi, G. and Zolla, L. (2008) Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). Journal of Proteomics 71: 391-411.

- Turgeon, A. J. (2002) Turfgrass management, 6th Ed. Prentice Hall, Upper Saddle Brook, NJ.
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., Mann, M. and Cox, J. (2016) The perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote) omics data. *Nature Methods* 13: 731-40.
- Wang, J., Ding, B., Guo, Y., Li, M., Chen, S., Huang, G. and Xie, X. (2014) Overexpression of a wheat phospholipase D gene, TaPLD α , enhances tolerance to drought and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 240: 103-115.
- Wilkinson, S. and Davies, W. J. (2002) ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell and Environment* 25: 195-210.
- Xu, L., Li, X., Han, L., Li, D. and Song, G. (2017) Epichloe endophyte infection improved drought and heat tolerance of tall fescue through altered antioxidant enzyme activity. *European Journal of Horticultural Science* 82: 90-97.
- Yang, Y., Li, X., Yang, S., Zhou, Y., Dong, C., Ren, J., Sun, X. and Yang, Y. (2015) Comparative physiological and proteomic analysis reveals the leaf response to cadmium-induced stress in poplar (*Populus yunnanensis*). *Plos One* 10: 1-20.
- Yin, L., Ren, A., Wei, M., Wu, L., Zhou, Y., Li, X. and Gao, Y. (2014) Neotyphodium coenophialum-infected tall fescue and its potential application in the phytoremediation of saline soils. *International Journal of Phytoremediation* 16: 235-246.
- Yu, X., Bai, G., Liu, S., Luo, N., Wang, Y., Richmond, D. S., Pijut, P. M., Jackson, S. A., Yu, J. and Jiang, Y. (2013) Association of candidate genes with drought tolerance traits in diverse perennial ryegrass accessions. *Journal of Experimental Botany* 64: 1537-1551.

A comparative leaf proteomics of two genotypes of *Lolium perenne* under drought stress

Fatemeh Raeisi-Vanani¹, Leila Shabani^{1,2}, Mohammad R. Sabzalilian³, Fariba Dehghanian⁴

¹Department of Plant Science, Faculty of Science, Shahrekord University, Iran

²Research Institute of Biotechnology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

³Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

⁴Division of Genetics, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, HezarJarib Street, Isfahan, Iran

(Received: 07/05/2019, Accepted: 17/07/2019)

Abstract

Drought stress is one of the main threats in reducing plant performance. It has been reported that endophyte infection improve drought tolerance in host grass species, but the mechanism responsible for the effect is not clear. Proteomics analysis is a beneficial tool for understanding the molecular mechanisms of drought resistance. In this study, proteomics approach was used to study the expression of drought responsible proteins in leaves of two genotypes of *Lolium perenne*. The experiment was set up in a completely randomized design with factorial test with two factors, the first factor was S10 (the endophyte-infected plants) and Speedy (non infected plants) genotypes and the second factor was two levels of water availability: control versus water stressed plants (about 80% moisture discharge). At first, according to TCA/acetone precipitation method total protein was extracted. The total dissolved protein was separated by SDS-PAGE electrophoresis. Identification of extracted proteins was performed by mass spectrometry technology and with proteome analysis responsive proteins was classified in different categories. It seems that fungal endophyte infected genotype with development of its root network, has more power to provide more water so perception of consequences of drought stress was delayed. Maybe symbiosis with fungal endophyte changed biochemistry and morphology of host plant and leads to increased threshold level of plant. The most induced proteins in infected genotype were in carbon and energy metabolism category. This genotype regulated different proteins of this class so kept active various processes such as photosynthesis as well as used ability of protective proteins in order to keep the activity of enzymes.

Keywords: Drought stress, Endophyte, Grass, *Lolium*, Proteomics.

Corresponding author, Email: lshabani@gmail.com

جدول ۱- پروتئین‌های دارای تغییرات معنی‌دار در ژنوتیپ‌های S10 و B.C. Speedy (گروه‌های عملکردی مهم)، No: شماره شناسایی، ID: کد شناسایی پروتئین، Δ: تغییرات بیان پروتئین‌ها در گیاهان تنش‌دیده در مقایسه با گیاهان کنترل، (کاهش بیان با علامت منفی نشان داده شده است). new: پروتئین جدید که در نمونه کنترل حضور ندارد. D: پروتئین ناپدیدشده که در تنش خشکی حضور ندارد.

BC	No	Name	ID	Δ:D/C, genotype	
				Speedy	S10
(Carbon and energy metabolism (1, 2, 3, 4, 5,6,7,8,9, 25))					
1	38	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	bradi3g07190.1	-	-
1	455	photosystem II reaction center PsbP family protein	bradi4g04640.1	-	-
1	560	PPL2 (PsbP-like protein 2)	bradi1g66296.1	-	-
1	19	cytochrome f apoprotein	bradi3g27332.1	-	-
1	5	ATPase alpha subunit	bradi5g08886.1	-	-
1	169	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit H, chloroplastic	bradi3g27266.1	-	-
1	53	PsaC subunit of photosystem I	bradi1g05756.1	-	-
1	85	PSAE-2 (photosystem I subunit E-2)	bradi1g29000.1	-	
1	215	oxidoreductase NAD-binding domain-containing protein	bradi2g24210.2	-	-
1	48	glycerate dehydrogenase	bradi3g00330.1	-	-
1	244	phosphoribulokinase	bradi2g46690.3	-	-
1	118	triose-phosphate isomerase	bradi4g36310.1	-	-
1	15	Fructose-bisphosphate aldolase (chl)	bradi4g24367.1	-	-
1	3	RCA (RUBISCO ACTIVASE)	bradi4g09125.2	-	-
1	26	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	bradi5g12330.1	-	-
3	609	aldo/keto reductase family protein	bradi1g58220.1	-	-
3	823	Alpha-galactosidase	bradi1g17730.1	-	-
7	423	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	bradi1g60050.1	-	-
7	667	transaldolase	bradi2g59370.1	-	-
8	561	fumarate hydratase	bradi1g63020.1	-	-
25	526	4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase	bradi1g29550.1	-	-
1	4	PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	bradi1g12130.1	-2.08832	-
1	32	PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	bradi1g24760.1	-3.26915	-
1	67	PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	bradi1g23610.2	-3.84442	-
1	207	PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	bradi4g37210.1	D	-
1	144	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	bradi3g17640.2	1.574311	-
1	235	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	bradi1g77047.1	-2.50196	-
1	47	PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	bradi1g06890.1	-4.4515	-
1	88	PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	bradi1g06890.2	-5.18164	-
1	506	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	bradi4g40710.1	-3.54445	-
1	164	PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	bradi1g06890.3	-2.19566	-
1	803	PS.lightreaction.cytochrome b6/f	bradi1g06890.4	D	-
1	72	PS.lightreaction.cytochrome b6/f.iron sulfur subunit	bradi1g06890.5	-2.16394	-
1	382	PS.lightreaction.cyclic electron flow-chlororespiration	bradi1g52550.7	-2.62169	-
1	424	PS.lightreaction.NADH DH	bradi5g17027.1	-2.62894	-
1	112	PS.calvin cycle.phosphoglycerate kinase	bradi3g05220.1	1.606817	-
1	912	PS.calvin cycle.transketolase	bradi5g07190.1	new	-
1	24	PS.calvin cycle.seduheptulose bisphosphatase	bradi2g55150.1	-2.56503	-
1	36	PS.calvin cycle.rubisco small subunit	bradi3g26391.2	2.601254	-
2	788	major CHO metabolism.synthesis.starch.starch synthase	bradi1g48610.1	2.478235	-
2	286	major CHO	bradi2g57500.1	1.953845	-

		metabolism.degradation.sucrose.fructokinase			
3	180	minor CHO metabolism.others	bradi1g58210.1	2.057853	-
3	719	minor CHO metabolism.others	bradi3g37327.1	new	-
4	106	glycolysis.cytosolic branch.UGPase	bradi4g37350.1	1.617126	-
2	390	major CHO metabolism.degradation.sucrose.hexokinase	bradi2g19400.3	1.635821	-
2	536	major CHO metabolism.degradation.sucrose.hexokinase	bradi2g49460.1	1.081691	-
4	594	glycolysis.cytosolic branch.pyruvate kinase (PK)	bradi5g26140.1	1.98627	-
4	422	glycolysis.plastid branch.glucose-6-phosphate isomerase	bradi4g32530.1	2.829449	-
6	648	gluconeogenesis / glyoxylate cycle.Malate DH	bradi3g37140.1	7.344565	-
6	721	gluconeogenesis / glyoxylate cycle.isocitrate lyase	bradi5g07880.1	9.105815	-
7	642	OPP.oxidative PP.6-phosphogluconate dehydrogenase	bradi3g46080.1	1.775471	-
7	236	OPP.non-reductive PP.ribose 5-phosphate isomerase	bradi1g55740.2	-3.80213	-
8	666	TCA / org transformation.TCA.pyruvate DH.E2	bradi3g36520.1	-2.94335	-
8	161	TCA / org transformation.TCA.aconitase	bradi3g15050.1	2.159319	-
8	368	TCA / org transformation.TCA.succinyl-CoA ligase	bradi3g49070.1	1.968666	-
8	60	TCA / org transformation.carbonic anhydrases	bradi2g44856.1	-3.57747	-
9	408	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.NADH-DH.complex I	bradi1g53070.1	2.892643	-
9	321	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.NADH-DH.localisation not clear	bradi1g11520.2	2.413694	-
9	433	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.NADH-DH.localisation not clear	bradi3g55340.1	1.677801	-
9	371	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.cytochrome c reductase	bradi1g54370.1	-3.08925	-
9	469	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.cytochrome c reductase	bradi3g44410.1	2.023088	-
9	23	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.F1-ATPase	bradi2g46790.2	1.559004	-
9	57	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.F1-ATPase	bradi2g13090.1	1.602017	-
9	156	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.F1-ATPase	bradi3g24730.1	3.262183	-
9	394	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.F1-ATPase	bradi3g02890.1	2.451356	-
9	482	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.F1-ATPase	bradi3g53000.1	1.846225	-
25	556	C1-metabolism	bradi4g31680.1	23.93588	-
1	25	PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	bradi4g07380.1	-	3.175224
1	457	PS.lightreaction.photosystem I.LHC-I	bradi2g42300.1	-	-2.477
1	99	PS.lightreaction.ATP synthase.subunit B (ATPF)	bradi5g08883.1	-	-2.74173
2	489	major CHO metabolism.degradation.glucose.Susy	bradi1g46670.3	-	2.950689
8	753	TCA / org transformation.other organic acid transformatons.atp-citrate lyase	bradi4g04390.1	-	3.39989
9	791	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.cytochrome c oxidase	bradi1g60710.2	-	2.446803
1	294	APE1 (ACCLIMATION OF PHOTOSYNTHESIS TO ENVIRONMENT)	bradi3g22030.1	1.561751	-
1	90	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	bradi3g42620.1	-3.24525	-
1	6	CP47, subunit of the photosystem II reaction center	bradi1g05740.1	1.630391	-
1	9	Photosystem II CP43 reaction center protein	bradi1g78082.1	3.078445	-
1	10	Photosystem II D2 protein	bradi1g78076.1	2.255155	-
1	17	PSBA Encodes chlorophyll binding protein D1, a part of the photosystem II reaction center core	bradi5g10966.1	1.705336	-
1	228	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	bradi3g39830.1	-28.4982	-

1	31	PSAA Encodes psaA protein comprising the reaction center for photosystem I along with psaB protein	bradi5g23845.1	3.685968	-
1	847	PSAH2, PSAH-2, PSI-H PSAH2 (PHOTOSYSTEM I SUBUNIT H2)	bradi2g16810.1	D	-
1	636	STN7 STN7 (Stt7 homolog STN7); kinase/protein kinase	bradi2g17660.1	1.672034	-
1	16	ATPA Encodes the ATPase alpha subunit	bradi5g23842.1	1.534743	-
1	226	PGR5-LIKE A PGR5-LIKE A	bradi1g00940.1	1.638358	-
1	465	NDH-O NDH-O (NAD(P)H:plastoquinone dehydrogenase complex subunit O)	bradi2g61410.1	-4.72291	-
1	69	Serine hydroxymethyltransferase	bradi1g09300.2	1.829602	-
1	1	RBCL, large subunit of RUBISCO	bradi3g27325.1	1.634211	-
1	22	Ribulose biphosphate carboxylase small chain	bradi5g04080.1	-2.13781	-
1	34	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Chl)	bradi1g76470.1	2.319031	-
1	503	Fructose-bisphosphate aldolase (Chl)	bradi2g01350.1	-5.43471	-
2	896	Starch-related R1 protein	bradi1g41907.2	new	-
3	64	mannose 6-phosphate reductase (NADPH-dependent)	bradi3g02340.1	5.071367	-
3	289	aldo/keto reductase family protein	bradi1g14710.1	1.646331	-
3	911	aldose 1-epimerase	bradi4g28160.1	new	-
3	716	Alpha-galactosidase	bradi3g29810.3	-3.24428	-
4	300	Glucose-6-phosphate isomerase	bradi2g37400.2	1.543041	-
1	40	Transketolase	bradi1g51670.1	1.681398	-
2	632	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	bradi4g27570.2	1.939504	-
2	645	cell wall invertase	bradi3g44990.2	-7.4971	-
2	708	sucrose cleavage protein-like	bradi3g56460.1	D	-
5	282	3-chloroalyl aldehyde dehydrogenase	bradi3g36150.2	1.987293	-
6	102	Malate dehydrogenase	bradi1g07170.2	1.674917	-
6	491	gluconeogenesis / glyoxylate cycle.pyruvate dikinase	bradi2g25745.1	2.07753	
7	375	Oxidoreductase	bradi2g07650.1	-2.55844	-
8	397	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	bradi3g41480.3	3.222228	-
8	603	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	bradi4g34810.1	4.474047	-
8	309	Citrate synthase	bradi3g06930.1	2.527388	-
8	336	Aconitate hydratase	bradi1g75960.2	2.651682	-
8	539	isocitrate dehydrogenase	bradi5g13490.1	2.360774	-
8	565	succinyl-CoA ligase	bradi1g23600.1	18.87783	-
8	412	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	bradi1g07020.1	2.369547	-
8	366	Malic enzyme	bradi2g33450.3	-2.61889	-
8	682	Malic enzyme	bradi1g27000.1	new	-
8	553	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	bradi3g43300.1	1.955641	-
9	878	mitochondrial ATP synthase g subunit	bradi2g42680.1	new	-
25	537	Formate dehydrogenase, mitochondrial	bradi1g42270.1	3.86486	-
25	777	Methylenetetrahydrofolate reductase	bradi1g04140.1	2.092876	-
9	786	NADH-ubiquinone oxidoreductase	bradi3g34360.1	-2.56905	-
1	54	D1 subunit of photosystem I and II reaction centers	bradi5g23844.1	-	-4.23532
1	843	PSAK (photosystem I subunit K)	bradi1g58350.1	-	D
1	142	ATPase epsilon subunit	bradi5g05674.1	-	-3.96558
1	33	ATPC1	bradi1g26350.1	-	-2.89078
1	42	(S)-2-hydroxy-acid oxidase	bradi1g06430.1	-	-2.32205
1	71	(S)-2-hydroxy-acid oxidase	bradi1g58480.1	-	-2.07373
1	11	Phosphoglycerate kinase	bradi2g21120.1	-	-2.54878
1	83	fructose-1,6-bisphosphatase	bradi1g67020.1	-	-2.1909
1	127	fructose-1,6-bisphosphatase	bradi2g56030.1	-	-2.08776
2	198	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	bradi1g09537.1	-	-2.34739
9	2	ATP synthase subunit beta	bradi2g20977.1	-	-2.44845

1	213	PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	bradi4g30060.2	-4.68508	-2.38262
1	63	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	bradi5g23866.1	-2.5263	-3.55498
1	901	PS.lightreaction.cyclic electron flow-chlororespiration	bradi1g74570.1	2.80505	new
8	617	TCA / org transformation.other organic acid transformatons.misc	bradi4g31310.1	9.193307	8.882547
1	186	Fructose-bisphosphate aldolase (cyto)	bradi1g36260.1	1.804895	-3.04297
2	176	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	bradi3g22330.1	2.904941	-2.33373
2	676	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	bradi2g55120.1	1.558683	1.530686
5	693	3-chloroallyl aldehyde dehydrogenase	bradi5g12617.1	2.64945	2.413262
8	569	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	bradi3g59750.1	3.14639	D
8	887	NADP-malic enzyme 1	bradi2g49540.1	new	new
Cell wall (10)					
10	885	NAD-dependent epimerase	bradi1g66440.1	-	-
10	872	glycosyl hydrolase family 3 protein	bradi5g16557.1	-	-
10	584	Pectinesterase	bradi2g11860.1	-	-
10	689	UDP-glucose 6-dehydrogenase	bradi1g08120.1	2.096863	-
10	327	glycosyl hydrolase family 3 protein	bradi1g08560.1	-2.83146	-
10	439	xylan 1,4-beta-xylosidase	bradi5g23470.1	-2.63727	-
10	835	polygalacturonase (pectinase)	bradi4g11087.1	-6.20741	-
10	875	GDP-mannose 3,5-epimerase	bradi3g26860.4	-	D
10	857	FLA11	bradi2g00220.1	D	5.151994
10	208	glycosyl hydrolase family 3 protein	bradi1g08570.1	-2.80628	-2.3508
Lipid metabolism (11)					
11	314	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (NADH)	bradi1g37040.1	-	-
11	524	sulfotransferase	bradi3g34340.1	-	-
11	678	quinone reductase family protein	bradi1g59450.1	-	-
11	818	triacylglycerol lipase	bradi5g15300.1	-	-
11	687	glycerophosphodiester phosphodiesterase/ kinase	bradi3g47340.1	-	-
11	745	lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.ACP protein	bradi1g62310.1	D	-
11	817	lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.ACP desaturase	bradi2g58930.1	D	-
11	724	lipid metabolism.lipid degradation.beta-oxidation.multifunctional	bradi3g10180.3	new	-
11	836	lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.Acetyl CoA Carboxylation	bradi3g24417.1	-	1.53956
11	795	protein malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	bradi1g65140.2	D	-
11	555	FQR1 (FLAVODOXIN-LIKE QUINONE REDUCTASE 1); FMN binding / oxidoreductase	bradi2g20710.1	-3.31743	-
11	600	Phospholipase D	bradi2g34290.1	3.221503	-
11	903	phospholipase	bradi2g04650.1	3.522037	-
11	656	phosphodiesterase	bradi3g39790.1	-2.72991	-
N and amino acid metabolism (12, 13)	N and amino acid metabolism (12, 13)	N and amino acid metabolism (12, 13)	N and amino acid metabolism (12, 13)	N and amino acid metabolism (12, 13)	N and amino acid metabolism (12, 13)
12	681	Glutamate dehydrogenase	bradi1g05680.1	-	-
13	174	Glutamate decarboxylase	bradi3g37830.1	-	-
13	443	Glutamate decarboxylase	bradi1g10480.1	-	-
13	94	ATMS1; 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase/ methionine synthase	bradi1g13290.1	-	-
13	383	Cysteine synthase	bradi5g00610.1	-	-

13	466	L,L-diaminopimelate aminotransferase	bradi1g47650.1	-	-
13	644	glyoxalase I family protein	bradi1g13190.1	-	-
13	826	acetyl-CoA C-acyltransferase	bradi3g55420.1	-	-
12	114	N-metabolism.ammonia metabolism.glutamate synthase	bradi1g19080.1	3.877064	-
13	547	amino acid metabolism.synthesis.aspartate family.misc.homoserine.aspartate semialdehyde dehydrogenase	bradi1g14590.1	2.959192	-
13	157	amino acid metabolism.synthesis.aspartate family.methionine	bradi4g01200.2	1.521601	-
13	363	amino acid metabolism.synthesis.branched chain group.common	bradi2g45330.1	2.163983	-
13	720	amino acid metabolism.synthesis.serine-glycine-cysteine group.serine.phosphoglycerate dehydrogenase	bradi3g37240.1	2.3329	-
13	464	amino acid metabolism.degradation.aromatic aa.tyrosine	bradi3g07130.1	-2.49039	-
13	572	amino acid metabolism.degradation.aromatic aa.tyrosine	bradi1g03130.1	D	-
13	192	amino acid metabolism.synthesis.serine-glycine-cysteine group.cysteine.OASTL	bradi4g01130.2	-6.17376	-
13	756	amino acid metabolism.degradation.aspartate family.threonine	bradi5g03830.1	-	2.692307
12	586	NITRITE REDUCTASE 1	bradi3g57990.1	1.819514	-
12	41	Glutamine synthetase	bradi5g24550.2	1.538017	-
12	388	Glutamine synthetase	bradi3g59970.1	-3.67499	-
13	249	(ASPARTATE AMINOTRANSFERASE 5	bradi3g54200.1	5.237107	-
13	661	Aspartate aminotransferase	bradi2g50500.1	2.16009	-
13	162	L-alanine:2-oxoglutarate aminotransferase	bradi1g59220.2	1.508573	-
13	762	ornithine carbamoyltransferase	bradi3g52727.1	1.678402	-
13	890	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	bradi1g07910.1	4.758007	-
13	171	Cysteine synthase	bradi2g53170.1	-11.1597	-
13	486	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	bradi2g18550.1	1.519773	-
13	525	Pyrroline-5-carboxylate reductase	bradi2g60730.1	1.976995	-
13	49	Glycine cleavage system P protein	bradi2g48010.1	2.303416	-
13	95	Aminomethyltransferase	bradi5g22290.1	1.922112	-
13	804	amino acid metabolism.synthesis.central amino acid metabolism.GABA.SSADH	bradi3g05490.1	3.056931	1.78696
13	685	2-isopropylmalate synthase	bradi4g43130.1	1.926745	2.033443
Secondary metabolism (16)	Secondary metabolism (16)	Secondary metabolism (16)	Secondary metabolism (16)	Secondary metabolism (16)	Secondary metabolism (16)
16	793	solanesyl diphosphate synthase 1	bradi2g15307.1	-	-
16	706	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase	bradi2g00650.1	-	-
16	766	/ 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	bradi3g48080.1	-	-
16	496	violaxanthin de-epoxidase	bradi5g07390.1	-	-
16	225	secondary metabolism.isoprenoids.non-mevalonate pathway	bradi3g59430.1	1.561997	-
16	729	secondary metabolism.sulfur-containing.misc.alliinase	bradi2g48267.1	1.542854	-
16	581	secondary metabolism.flavonoids.dihydroflavonols.dihydroflavonol 4-reductase	bradi1g35742.1	-6.70729	-
16	806	secondary metabolism.isoprenoids.mevalonate pathway.isopentenyl pyrophosphate:dimethylallyl pyrophosphate isomerase	bradi1g25350.1	D	-
16	779	4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase	bradi2g52610.1	new	-

16	238	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	bradi4g01640.1	1.773624	-
16	842	isoflavone reductase	bradi4g05455.1	D	-
16	785	homogentisate farnesyltransferase	bradi2g18210.1	4.816604	-5.89711
Hormone metabolism (17)	Hormone metabolism (17)	Hormone metabolism (17)	Hormone metabolism (17)	Hormone metabolism (17)	Hormone metabolism (17)
17	665	AILP1	bradi4g42890.1	-	-
17	862	unknown protein	bradi1g08930.1	-	-
17	504	hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	bradi2g43690.1	4.533726	-
17	515	hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	bradi3g48197.1	2.635557	-
17	655	hormone metabolism.ethylene.synthesis-degradation	bradi3g57520.1	3.589018	-
17	546	NCED4	bradi3g52680.1	D	-
17	214	NCED1, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	bradi4g00335.1	1.518522	-
Stress (20)	Stress (20)	Stress (20)	Stress (20)	Stress (20)	Stress (20)
20	124	oxalate oxidase	bradi3g37670.1	-	-
20	736	stress.biotic	bradi4g05440.1	1.621153	-
20	62	stress.abiotic.heat	bradi1g66590.1	1.517688	-
20	129	stress.abiotic.heat	bradi3g39630.1	1.75309	-
20	255	stress.abiotic.heat	bradi4g04220.1	1.553727	-
20	426	stress.abiotic.heat	bradi4g32941.1	1.611915	-
20	451	stress.abiotic.heat	bradi2g33682.1	1.780284	-
20	153	stress.abiotic.drought/salt	bradi2g07940.1	-2.52085	-
20	308	stress.abiotic.heat	bradi1g66470.1	-	2.265283
20	523	stress.abiotic.heat	bradi4g41057.1	-	2.084851
20	882	DNAJ-1	bradi1g06340.1	D	-
20	907	DNAJ heat shock protein	bradi3g54550.1	1.784582	-
20	739	ERD4 ERD4 (early-responsive to dehydration 4)	bradi1g58380.1	5.264365	-
20	550	germin-like protein	bradi1g11920.1	-23.4745	-
20	822	GL22	bradi2g11050.1	-5.59635	-
20	472	protein Leucine Rich Repeat family	bradi1g56690.1	53.73592	-2.60115
20	448	universal stress protein (USP)	bradi2g34910.1	3.452202	-3.44858
Redox (21)	Redox (21)	Redox (21)	Redox (21)	Redox (21)	Redox (21)
21	137	Thioredoxin M-type	bradi4g40800.1	-	-
21	276	CB5-B (CYTOCHROME B5 ISOFORM B)	bradi2g62010.1	-	-
21	358	MSBP1 (membrane steroid binding protein 1)	bradi3g30180.1	-	-
21	149	L-ascorbate peroxidase	bradi1g16510.1	-	-
21	240	Glutathione peroxidase	bradi1g47140.1	-	-
21	509	glutathione-disulfide reductase	bradi3g55030.2	-	-
21	84	Catalase	bradi1g76330.2	-	-
21	328	NADH-cytochrome b5 reductase	bradi2g04610.1	-	-
21	370	redox.thioredoxin	bradi5g26060.1	-4.44172	-
21	518	redox.ascorbate and glutathione	bradi3g53920.1	D	-
21	145	redox.ascorbate and glutathione.ascorbate	bradi4g38430.1	2.52089	-
21	277	redox.ascorbate and glutathione.ascorbate	bradi1g45010.1	-4.06015	-
21	391	redox.ascorbate and glutathione.glutathione	bradi2g34770.1	2.485854	-
21	59	redox.peroxiredoxin	bradi1g46620.1	-2.74917	-
21	387	redox.peroxiredoxin	bradi2g46380.2	new	-
21	143	redox.dismutases and catalases	bradi3g01470.1	2.22378	-
21	119	CHLOROPLASTIC DROUGHT-INDUCED STRESS PROTEIN OF 32 KD)	bradi1g28090.1	1.783703	-
21	453	disulfide isomerase	bradi2g35020.1	1.727304	-
21	698	Thioredoxin M-type	bradi5g16550.1	-2.39017	-
21	858	Thioredoxin reductase	bradi3g53200.1	D	-
21	274	DEHYDROASCORBATE REDUCTASE 2	bradi2g37480.1	2.164143	-

21	425	ascorbate peroxidase 1	bradi1g65820.2	D	-
21	802	monodehydroascorbate reductase	bradi3g17120.1	new	-
21	821	ASCORBATE PEROXIDASE 3	bradi5g03640.1	8.10606	-
21	125	Dihydrolipoyl dehydrogenase	bradi2g12310.1	2.426139	-
21	673	heme-binding family protein	bradi1g36860.1	new	-
21	692	glutathione disulfide oxidoreductase	bradi1g01570.1	1.753645	-
21	61	peroxiredoxin type 2	bradi3g06750.1	2.827772	-
21	522	peroxiredoxin type 2	bradi1g35660.1	new	-
21	101	superoxide dismutase	bradi3g43070.1	-4.28992	-
21	195	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	bradi1g18340.2	-	1.629304
21	557	Thioredoxin reductase	bradi1g19140.1	2.715588	D
DNA/RNA (27, 28)	DNA/RNA (27, 28)	DNA/RNA (27, 28)	DNA/RNA (27, 28)	DNA/RNA (27, 28)	DNA/RNA (27, 28)
27 (RNA)	650	LIL3;1; transcription factor	bradi3g02570.1	-	-
27	832	HMG1/2-like protein	bradi1g29730.4	-	-
27	7	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	bradi3g16227.1	-	-
27	476	DNA-binding protein	bradi5g16720.1	-	-
27	848	Nascent polypeptide-associated complex subunit beta	bradi1g77957.1	-	-
27	194	CSP41A (CHLOROPLAST STEM-LOOP BINDING PROTEIN OF 41 KDA)	bradi1g54030.1	-	-
27	722	RNA binding	bradi2g36710.1	-	-
27	870	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	bradi3g28430.1	-	-
28 (DNA)	75	histone H3.2	bradi3g45290.1	-	-
28	239	H2B	bradi2g27760.1	-	-
28	414	Histone H2A	bradi2g37327.1	-	-
27	747	RNA.processing.RNA helicase	bradi2g40800.1	1.959845	-
27	378	RNA.processing.ribonucleases	bradi1g26277.1	-2.08014	-
27	695	RNA.regulation of transcription.MADS box transcription factor family	bradi4g11097.1	2.447552	-
27	902	RNA.regulation of transcription.putative transcription regulator	bradi2g01860.1	new	-
28	886	DNA.synthesis/chromatin structure.histone	bradi2g00530.1	5.370516	-
28	755	DNA.unspecified	bradi1g10340.2	-13.9158	-
27	770	RNA.processing	bradi4g08430.1	-	3.224885
27	910	RNA.processing.splicing	bradi4g09940.1	-	1.657794
27	110	RNA.RNA binding	bradi4g38260.1	-	-3.90413
27	120	EIF4A1 (EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4A1)	bradi1g34170.3	1.880454	-
27	833	NF-YC4 (NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT C4)	bradi1g67980.1	D	-
27	271	PTAC4 (PLASTID TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE4)	bradi1g18320.1	-3.68388	-
27	726	chloroplast nucleoid DNA-binding protein	bradi3g56660.1	-2.09847	-
28	490	NAP1;1 (NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN1;1)	bradi2g18330.1	-2.15132	-
28	20	Histone H2B	bradi3g54520.1	-2.613	-
28	21	Histone H4	bradi4g37340.1	-2.28601	-
28	68	Histone H2A	bradi2g62450.1	-3.63593	-
28	89	Histone H2A	bradi4g06010.1	-2.48098	-
28	107	Histone H2A	bradi1g66370.1	-3.35126	-
28	512	Histone H2A	bradi1g09060.1	-2.24176	-
28	520	no original description	bradi1g05330.1	-6.05896	-
28	748	Histone H2A	bradi1g25400.1	-2.97934	-
27	570	Nascent polypeptide-associated complex subunit beta	bradi3g29087.1	-	-2.27878
27	787	CP33; RNA binding	bradi1g57190.1	-5.77674	3.386512
Protein (29)					
29	684	Alanine--tRNA ligase	bradi3g22760.1	-	-
29	296	Ribosomal protein S7	bradi1g05710.1	-	-

29	151	ribosomal protein L1 family protein	bradi2g26940.1	-	-
29	404	a chloroplast ribosomal protein L14	bradi3g27300.1	-	-
29	297	50S ribosomal protein L24, chloroplast (CL24)	bradi1g33030.1	-	-
29	701	50S ribosomal protein L33, chloroplastic	bradi1g05754.1	-	-
29	224	40S ribosomal protein S10 (RPS10A)	bradi2g61560.1	-	-
29	421	40S ribosomal protein S16 (RPS16A)	bradi4g26140.1	-	-
29	709	RPS18C (S18 RIBOSOMAL PROTEIN)	bradi1g05670.1	-	-
29	329	40S ribosomal protein S19 (RPS19B)	bradi3g56527.1	-	-
29	411	40S ribosomal protein S2 (RPS2D)	bradi1g04660.1	-	-
29	459	structural constituent of ribosome	bradi1g62690.2	-	-
29	284	40S ribosomal protein S23 (RPS23B)	bradi2g54210.1	-	-
29	365	40S ribosomal protein S9 (RPS9C)	bradi4g07120.1	-	-
29	449	60S ribosomal protein L10 (RPL10C)	bradi2g34440.6	-	-
29	197	60S ribosomal protein L12 (RPL12A)	bradi5g20330.1	-	-
29	350	60S ribosomal protein L13	bradi3g16170.3	-	-
29	121	60S ribosomal protein L4/L1 (RPL4A)	bradi1g05510.1	-	-
29	662	Ribosomal protein L19	bradi1g63010.2	-	-
29	483	60S ribosomal protein L26 (RPL26B)	bradi2g06250.1	-	-
29	307	60S ribosomal protein L27	bradi1g30210.1	-	-
29	657	60S ribosomal protein L32 (RPL32A)	bradi4g34340.2	-	-
29	254	60S ribosomal protein L34 (RPL34A)	bradi3g16620.1	-	-
29	369	60S ribosomal protein L36	bradi2g54600.2	-	-
29	229	RPL5A	bradi5g09500.1	-	-
29	519	Ribosomal protein	bradi4g38510.1	-	-
29	393	60S ribosomal protein L13A (RPL13aD)	bradi1g08260.1	-	-
29	330	60S ribosomal protein L17 (RPL17A)	bradi4g08667.1	-	-
29	285	60S ribosomal protein L21 (RPL21C)	bradi1g75620.1	-	-
29	534	60S ribosomal protein L35a (RPL35aC)	bradi4g16690.3	-	-
29	237	60S ribosomal protein L7A (RPL7aA)	bradi4g34750.1	-	-
29	232	60S ribosomal protein L6	bradi3g08900.1	-	-
29	372	60S ribosomal protein L8 (RPL8C)	bradi4g04120.2	-	-
29	56	Elongation factor Tu	bradi3g47690.1	-	-
29	138	Elongation factor G, chloroplastic	bradi5g16980.1	-	-
29	415	elongation factor 1B alpha-subunit 2 (eEF1Balpha2)	bradi1g18710.1	-	-
29	351	mitochondrial processing peptidase beta subunit	bradi1g70180.1	-	-
29	178	translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts	bradi3g29750.1	-	-
29	441	TIC55 (TRANSLOCON AT THE INNER ENVELOPE MEMBRANE OF CHLOROPLASTS 55)	bradi3g53860.1	-	-
29	740	protein transport protein SEC61 gamma subunit	bradi1g31180.1	-	-
29	189	protein serine/threonine kinase	bradi1g08287.1	-	-
29	473	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	bradi1g05750.1	-	-
29	435	aspartyl protease family protein	bradi2g16160.1	-	-
29	605	serine carboxypeptidase S28 family protein	bradi3g30640.1	-	-
29	190	CPN20 (CHAPERONIN 20)	bradi4g31220.1	-	-
29	377	GrpE protein homolog	bradi3g48540.1	-	-
29	446	CPN20 (CHAPERONIN 20)	bradi1g46596.1	-	-
29	733	GrpE protein homolog	bradi4g27270.1	-	-
29	812	PDF6 (REFOLDIN 6)	bradi3g09300.1	-	-
29	111	photosystem II stability/assembly factor	bradi1g29500.1	-	-
29	691	photosystem I assembly and stability	bradi2g13078.1	-	-
29	717	Eukaryotic translation initiation factor 5A	bradi1g59110.1	-	-
29	352	Proteasome subunit alpha type	bradi3g49610.2	-	-
29	210	RD21 (responsive to dehydration 21)	bradi5g24027.1	-	-
29	727	cysteine-type peptidase	bradi4g31440.3	-	-
29	889	aspartyl protease family protein	bradi4g36720.2	-	-
29	338	protein.synthesis.ribosomal protein.prokaryotic.chloroplast.30S subunit.S18	bradi1g05752.1	-2.23136	-
29	230	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S	bradi3g16150.1	2.411518	-

		subunit.S3			
29	629	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S24	bradi3g08680.1	-2.39151	-
29	852	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S27	bradi3g43475.1	1.504212	-
29	531	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S28	bradi4g13910.1	3.582534	-
29	193	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.SA	bradi1g23780.1	1.68777	-
29	182	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S4	bradi2g35620.1	3.034154	-
29	544	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S6	bradi1g21320.2	2.8355	-
29	220	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L3	bradi4g41680.1	1.704351	-
29	510	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.P1	bradi3g13750.1	new	-
29	205	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L9	bradi3g00640.1	3.250718	-
29	567	protein.synthesis.initiation	bradi3g53970.2	-9.61453	-
29	81	protein.synthesis.elongation	bradi1g06860.8	4.58633	-
29	223	protein.synthesis.elongation	bradi1g37490.1	2.980046	-
29	462	protein.targeting.mitochondria	bradi2g05710.1	1.776368	-
29	690	protein.targeting.chloroplast	bradi2g03350.1	3.249885	-
29	825	protein.targeting.chloroplast	bradi2g35587.1	-2.37673	-
29	899	protein.targeting.chloroplast	bradi1g66820.1	new	-
29	635	protein.degradation	bradi3g60550.1	2.113161	-
29	880	protein.degradation	bradi3g35350.1	new	-
29	488	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	bradi5g24960.1	-2.50597	-
29	551	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	bradi2g33390.2	3.12345	-
29	588	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	bradi3g07370.4	1.920749	-
29	631	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	bradi5g13800.1	2.800021	-
29	688	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	bradi4g35156.2	-4.48593	-
29	705	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	bradi3g03720.1	3.223939	-
29	751	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	bradi4g34620.1	new	-
29	794	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	bradi1g49140.1	1.612003	-
29	140	protein.degradation.serine protease	bradi4g39880.1	1.828929	-
29	43	protein.folding	bradi1g50270.1	2.110535	-
29	116	protein.folding	bradi1g00730.1	1.5706	-
29	260	protein.folding	bradi3g41800.1	-2.35206	-
29	312	protein.folding	bradi1g75520.1	3.384791	-
29	334	protein.folding	bradi3g00480.2	4.186734	-
29	392	protein.folding	bradi1g54970.1	-2.12366	-
29	558	protein.folding	bradi5g02990.2	-3.7227	-
29	595	protein.assembly and cofactor ligation	bradi1g63380.1	-2.01256	-
29	261	protein.synthesis.ribosomal protein.prokaryotic.chloroplast.30S subunit.S4	bradi2g13104.1	-	-2.03547
29	98	protein.synthesis.ribosomal protein.prokaryotic.chloroplast.50S subunit.L12	bradi2g45730.1	-	-2.92665
29	253	protein.synthesis.ribosomal protein.prokaryotic.chloroplast.50S subunit.L15	bradi1g69650.1	-	-2.46165
29	810	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S11	bradi5g21630.1	-	1.93791
29	790	protein.synthesis.ribosomal protein.unknown.small subunit.S19	bradi1g71472.1	-	-2.20875
29	247	protein.synthesis.elongation	bradi3g05950.1	-	-2.51345
29	675	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	bradi2g27390.1	-	D
29	442	tRNA synthetase class II	bradi4g07854.1	-3.03675	-
29	769	aminoacyl-tRNA ligase	bradi1g56640.2	new	-
29	827	aminoacyl-tRNA ligase	bradi1g56890.1	3.537549	-
29	868	30S ribosomal protein S15, chloroplastic	bradi3g27272.1	D	-
29	768	chloroplast 30S ribosomal protein S20	bradi2g46520.1	-4.30738	-

29	471	30S ribosomal protein	bradi1g00980.2	-2.1138	-
29	492	emb1473 (embryo defective 1473); structural constituent of ribosome	bradi2g49850.1	-8.66322	-
29	487	ribosomal protein L17 family protein	bradi1g04130.2	-2.17765	-
29	355	chloroplast ribosomal protein L23	bradi5g05656.1	-3.37007	-
29	256	RIBOSOMAL PROTEIN LARGE SUBUNIT 27	bradi2g59210.1	-3.21803	-
29	659	50S ribosomal protein L28	bradi2g40040.1	-2.23672	-
29	416	ribosomal protein L29	bradi3g58780.1	-26.5967	-
29	147	RPL4; poly(U) binding / structural constituent of ribosome	bradi1g67170.1	-2.2007	-
29	612	structural constituent of ribosome	bradi3g13810.1	-2.14668	-
29	258	40S ribosomal protein S14	bradi3g45000.1	2.432429	-
29	851	40S ribosomal protein S25	bradi4g38580.1	D	-
29	514	40S ribosomal protein S26	bradi1g04070.1	1.592593	-
29	477	40S ribosomal protein S15A	bradi2g54450.1	-2.63185	-
29	400	40S ribosomal protein S8	bradi3g43560.1	1.915357	-
29	246	RPL16A; structural constituent of ribosome	bradi3g09030.1	1.6107	-
29	478	60S ribosomal protein L4/L1 (RPL4A)	bradi1g55510.1	2.129898	-
29	627	60S ribosomal protein L18	bradi1g17970.1	new	-
29	272	60S ribosomal protein L18a	bradi2g50020.1	-2.4449	-
29	304	RPL23A	bradi5g14750.2	-2.31178	-
29	590	structural constituent of ribosome	bradi1g21630.1	-7.97999	-
29	781	60S ribosomal protein L37a (RPL37aB)	bradi2g46580.1	D	-
29	216	60S ribosomal protein L7 (RPL7D)	bradi5g20900.1	-2.13615	-
29	201	60S acidic ribosomal protein P0 (RPP0A)	bradi3g14340.1	1.82004	-
29	616	protein ribosome-like protein	bradi3g06530.1	-3.46813	-
29	288	nascent polypeptide associated complex alpha chain protein	bradi2g27190.1	-2.23281	-
29	460	NACA2 (NASCENT POLYPEPTIDE-ASSOCIATED COMPLEX SUBUNIT ALPHA-LIKE PROTEIN 2)	bradi1g77100.1	-2.24275	-
29	713	translation elongation factor	bradi2g45070.1	4.073928	-
29	275	RRF (RIBOSOME RECYCLING FACTOR, CHLOROPLAST PRECURSOR)	bradi1g24110.2	-2.18245	-
29	131	THF1	bradi1g24860.3	-8.94675	-
29	856	NTF2A (NUCLEAR TRANSPORT FACTOR 2A)	bradi3g41310.1	D	-
29	860	nuclear transport factor 2 (NTF2)	bradi5g07090.2	-2.79283	-
29	658	SCY1 (SecY Homolog 1); P-P-bond-hydrolysis-driven protein transmembrane transporter	bradi3g19100.1	2.785402	-
29	694	Protein translocase subunit SecA	bradi2g12067.1	2.46328	-
29	380	ARF1A1C	bradi1g53867.1	-2.01653	-
29	809	Protein transport protein Sec61 subunit beta	bradi4g45150.1	-3.41711	-
29	805	STN8	bradi2g22210.1	new	-
29	234	cytosol aminopeptidase	bradi3g54020.1	2.574428	-
29	323	unknown protein	bradi3g47890.1	-2.57418	-
29	376	serine-type endopeptidase	bradi3g56280.1	4.450129	-
29	543	acylaminoacyl-peptidase	bradi3g26780.4	2.260805	-
29	577	peptidase M1	bradi3g12520.2	1.59857	-
29	754	Aminopeptidase	bradi3g08120.1	new	-
29	789	ubiquitin activating enzyme	bradi1g65320.1	7.08464	-
29	402	aspartyl protease	bradi2g36862.1	-3.40828	-
29	580	ubiquitin-protein ligase	bradi3g00340.1	D	-
29	782	aspartyl aminopeptidase	bradi4g39590.1	D	-
29	150	ATPREP1 (PRESEQUENCE PROTEASE 1)	bradi3g58166.1	2.217318	-
29	535	membrane-associated zinc metalloprotease	bradi1g15560.1	2.090935	-
29	562	aminopeptidase	bradi2g28680.2	1.624505	-
29	807	protein.degradation.AAA type	bradi1g74922.1	2.626195	-
29	73	CPN60A (CHAPERONIN-60ALPHA)	bradi5g02890.2	3.109458	-
29	385	ERD1 (EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 1)	bradi3g44640.1	1.974712	-

29	468	HSP60 (HEAT SHOCK PROTEIN 60)	bradi3g28070.1	new	-
29	563	Peptidylprolyl isomerase	bradi1g27190.5	2.284253	-
29	578	mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17	bradi1g64590.1	6.100464	-
29	608	50S ribosomal protein L35	bradi0007s0021	-	-2.18939
29	801	protein 50S ribosomal	bradi2g52710.1	-	2.215075
29	772	Small ubiquitin-related modifier	bradi2g58830.1	-	1.882823
29	623	Proteasome subunit alpha type	bradi4g13740.2	-	-2.20083
29	646	Peptidylprolyl isomerase	bradi3g01630.1	-	-4.58092
29	395	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S7	bradi3g23310.1	1.610313	-2.44371
29	571	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L3	bradi4g24610.1	2.850109	D
29	879	protein.synthesis.elongation	bradi1g01580.1	2.100885	new
29	871	60S ribosomal protein L22-2 (RPL22B)	bradi1g62830.1	D	D
29	865	nascent polypeptide associated complex alpha chain protein	bradi1g62360.1	D	new
29	209	TIC110 (TRANSLOCON AT THE INNER ENVELOPE MEMBRANE OF CHLOROPLASTS 110)	bradi3g29760.1	D	-2.52611
29	461	ribosomal protein L18 family protein	bradi1g03220.1	-2.11487	-4.62525
29	696	40S ribosomal protein S15	bradi2g20390.1	1.587623	-2.31671
29	367	GrpE protein homolog	bradi5g10250.1	-5.0556	-6.50321
29	493	Peptidylprolyl isomerase	bradi3g59057.2	-3.3064	-2.96201
Cell/signaling/development (30, 31, 33)					
30	270	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	bradi3g09010.2	-	-
30	861	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	bradi2g43110.1	-	-
30	484	GTP binding	bradi2g12510.1	-	-
30	498	Obg-like ATPase 1	bradi1g06772.1	-	-
30	440	GTP-binding nuclear protein	bradi2g15730.1	-	-
30	554	Obg-like ATPase 1	bradi3g17680.1	-	-
30	305	GF14b protein	bradi3g38640.2	-	-
31	206	plastid-lipid associated protein PAP	bradi4g14630.1	-	-
31	302	Annexin	bradi3g58830.1	-	-
31	830	Annexin	bradi4g29680.2	-	-
31	432	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	bradi1g24500.1	-	-
31	829	Peptidylprolyl isomerase	bradi2g58640.1	-	-
33	670	cupin family protein	bradi2g37470.1	-	-
30	463	signalling.light	bradi4g33940.1	D	-
30	231	signalling.calcium	bradi2g57537.1	-2.94629	-
30	831	signalling.calcium	bradi1g68010.1	-11.0203	-
30	343	signalling.G-proteins	bradi2g41180.1	2.376508	-
30	344	signalling.G-proteins	bradi2g19750.2	1.980871	-
30	914	signalling.G-proteins	bradi5g13000.1	2.588728	-
30	410	signalling.14-3-3 proteins	bradi4g16640.1	9.589595	-
31	96	cell.organisation	bradi3g30710.2	1.806944	-
31	674	cell.organisation	bradi2g39590.1	1.67949	-
31	470	cell.cycle.peptidylprolyl isomerase	bradi2g11060.1	-2.12336	-
31	664	cell.cell death.plants	bradi1g75270.1	7.349729	-
33	850	development.late embryogenesis abundant	bradi1g02090.2	-3.61818	-
33	437	development.unspecified	bradi3g14650.1	-2.30059	-
33	702	development.unspecified	bradi3g41430.1	D	-
33	874	development.unspecified	bradi2g47940.1	3.735882	-
30	379	CRT1 (CALRETICULIN 1)	bradi1g02940.2	-3.59889	-
30	405	sodium/calcium exchanger family protein	bradi2g06830.1	3.676624	-
30	869	CAM5 (CALMODULIN 5)	bradi2g52940.1	-2.65477	-
30	480	GTP binding	bradi3g47240.1	3.362543	-

30	573	GTP binding	bradi1g03490.1	4.664529	-
30	839	GTP binding	bradi2g23120.1	1.805323	-
30	292	14-3-3-like protein	bradi5g12510.2	-2.75354	-
30	846	RALFL33 (ralf-like 33)	bradi4g05500.1	D	-
31	345	Tubulin beta chain	bradi1g06800.1	2.332958	-
31	778	plastid-lipid associated protein PAP	bradi3g30740.2	1.568683	-
31	808	Peptidylprolyl isomerase	bradi4g34370.1	-5.90996	-
31	888	Clathrin heavy chain	bradi4g26877.1	new	-
30	419	CAM5 (CALMODULIN 5)	bradi2g21460.1	-	1.557196
Transport (34)					
34	837	(NON-INTRINSIC ABC PROTEIN 6)	bradi2g01870.1	-	-
34	828	PIP2B (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2); water channel	bradi5g15970.1	-	-
34	181	antiporter/ triose-phosphate transmembrane transporter	bradi2g08340.1	-	-
34	154	transport.p- and v-ATPases	bradi5g24690.1	3.163213	-
34	104	transport.p- and v-ATPases.H+-transporting two-sector ATPase	bradi1g31690.2	1.997175	-
34	652	transport.ABC transporters and multidrug resistance systems	bradi2g01610.1	-3.74029	-
34	134	transport.Major Intrinsic Proteins.PIP	bradi1g28760.2	2.271713	-
34	167	transport.Major Intrinsic Proteins.PIP	bradi3g56020.1	1.997584	-
34	669	transport.calcium	bradi4g45030.1	2.553294	-
34	602	transport.metabolite transporters at the mitochondrial membrane	bradi1g71410.2	-	2.005531
34	268	transport.misc	bradi3g48590.1	-	1.762503
34	132	transport.unspecified anions.arsenite-transporting ATPase	bradi3g59400.1	-	-2.20085
34	540	V-type proton ATPase subunit a	bradi1g67960.1	3.025514	-
34	784	V-type proton ATPase subunit G	bradi5g20650.1	3.338263	-
34	389	VHA-E3 (VACUOLAR H+-ATPASE SUBUNIT E ISOFORM 3)	bradi2g45580.1	1.768395	-
34	575	V-type proton ATPase subunit	bradi2g42100.1	2.642825	-
34	613	non-intrinsic ABC protein 8	bradi1g28416.2	7.906712	-
34	438	PIP2B (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2); water channel	bradi3g49360.1	2.440507	-
34	530	PIP1;4 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1;4); water channel	bradi5g18170.1	3.03425	-
34	763	TMT2 (TONOPLAST MONOSACCHARIDE TRANSPORTER2)	bradi3g32210.2	new	-
34	909	SUT4 (SUCROSE TRANSPORTER 4)	bradi4g00320.1	5.386176	-
34	233	(Pyrophosphate-energized inorganic pyrophosphatase) (H(+)-PPase)	bradi1g47767.1	5.257463	-
34	841	amino acid transporter family protein	bradi3g53740.1	new	-
34	813	ADP,ATP carrier protein	bradi3g07830.1	new	-
34	863	antiporter/ triose-phosphate transmembrane transporter	bradi4g27550.1	1.999915	-
34	217	dicarboxylate/tricarboxylate carrier (DTC)	bradi2g32600.2	1.864631	-
34	221	mitochondrial phosphate transporter	bradi3g57890.1	2.900163	-
34	474	oxoglutarate:malate antiporter	bradi3g38580.1	2.261047	-
34	517	TEMPERATURE-INDUCED LIPOCALIN	bradi3g36970.1	5.162512	-
34	450	transport.metabolite transporters at the mitochondrial membrane	bradi3g34077.1	-2.06711	-2.33428