

بررسی ارتباط انتقال رشد رویشی به زایشی با بیان پروتئین های سرما القایی با استفاده از روش پروتئومیکس در گندم تحت شرایط مزرعه

محسن جان محمدی^۱، رضا توکل افشاری^{۲*}، سیروس محفوظی^۳، هوشنگ علیزاده^۴ و هانس پیترماک^۵
۱، استادیار دانشگاه مراغه، ۲، ۴، استاد و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۳، دانشیار
موسسه تهیه و اصلاح نهال و بذر کرج، ۵، استاد مرکز تحقیقات IPK آلمان
(تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۲۸ - تاریخ تصویب: ۹۰/۱۱/۱۹)

چکیده

به منظور درک بهتر تغییرات پروتئین ها در حین انتقال از مرحله رویشی به زایشی آزمایشی با استفاده از روش تجزیه پروتئوم در رقم گندم متحمل به سرما (نورستار) تحت شرایط مزرعه ای در مناطق سرد (فیروزکوه و زنجان) و منطقه معتدل به سرما (کرج) انجام گردید. پروتئین ها از برگ گیاهان در طی ۳ مرحله رشدی شامل T۱: مرحله رویشی، زمانی که گیاهان تحمل به انجماد خود را افزایش دادند (۳ آذرماه)، T۲: نقطه تامین نیاز بهاره سازی در نورستار و زمانی که این رقم حداکثر تحمل به انجماد را بدست آوردند (۳۰ آذرماه) و T۳: بعد از انتقال گیاهان از مرحله رویشی به زایشی و کاهش تحمل به انجماد (۳ اسفندماه) استخراج شدند. تغییرات درستت پروتئین ها با استفاده از ژل های بررسی و شناسایی پروتئین ها از طریق روش ESI-MS/MS و MALDI-TOF صورت گرفت. بررسی الگوی بیان لکه ها در کرج نشان داد که بیان ۱۱ لکه در شاهد و T1 روند نسبتاً ثابتی داشته و با رسیدن به مرحله حداکثر تحمل به انجماد (T2) بیانشان افزایش یافته و پس از این مرحله نیز با شروع رشد زایشی بیان آنها بطور معنی داری کاهش یافت. بررسی الگوی بیان پروتئین ها در منطقه فیروزکوه نشان داد که روند بیان ۳۴ لکه مشابه روند تحمل به انجماد در طی تاریخ های نمونه برداری می باشد. بررسی الگوی بیان لکه ها در منطقه زنجان نشان داد که بیان ۳۶ پروتئین با افزایش تحمل به انجماد در مرحله T1 کاهش یافت و با رسیدن به حداکثر تحمل به انجماد بیان این لکه ها به حداقل رسید و با شروع رشد زایشی مجدداً افزایش نشان دادند. مقایسه پروتئوم در منطقه زنجان و کرج در زمان شروع عادت دهی به سرما نشان داد که بیان برخی از پروتئین های سرما القایی در منطقه زنجان بیشتر از منطقه کرج می باشد. مقایسه پروتئوم در منطقه فیروزکوه و کرج نیز نشان داد که برخی از پروتئین های بخش روشنایی فتوسنتز و نیز پروتئین های درگیر در مسیر گلیکولیز در منطقه فیروزکوه بیشتر بودند. ۲۲ درصد از کل پروتئین های شناسایی شده در کلروپلاست جای داشتند که این امر بر نقش مهم این اندامک در حین عادت دهی به سرما و انتقال مرحله نمو تأکید دارد. پروتئین های با بیشترین تغییرات عمدتاً در مسیرهای فتوسنتز، گلیکولیز، تاخوردگی پروتئین ها، تعادل وضعیت اکسیداسیون و احیاء، نسخه برداری، ترجمه، بیوسنتز اسیدهای آمینه، تولید ATP و انتقال یون مشارکت داشتند.

واژه های کلیدی: گندم، سرمادهی، رشد رویشی، رشد زایشی، پروتئومیکس

مقدمه

بررسی روند تحمل به انجماد در غلات زمستانه حاکی از آن است که غلات پس از مرحله جوانه زنی و سبز شدن^۱ در طول دوره رویشی تحمل به انجماد خود را افزایش داده به طوری که در اواخر مرحله رویشی که مصادف با تأمین نیاز بهاره سازی^۲ می باشد بیشترین تحمل را در برابر انجماد دارا می باشند و با ورود به مرحله زایشی این توانایی را از دست می دهند. آغاز مرحله زایشی با تشکیل برجستگی های دوگانه^۳ در روی آغازه های^۴ نوک ساقه مشخص می گردد (Janmohammadi et al., 2010). کاهش ناگهانی تحمل به انجماد پس از ورود به مرحله زایشی گیاهان را ملزم می سازد تا جهت سازگاری با محیط، مراحل رشدی خود را به طور دقیق برنامه ریزی کرده و از مصادف شدن مراحل حساس نمودی با شرایط سخت فصلی (نظیر سرمای زمستان) جلوگیری نمایند. دستیابی به این مهم می تواند از طریق برخی از صفات نمودی^۵ نظیر نیاز بهاره سازی، نیاز فتوپریودی، افزایش تعداد برگ نهایی (FLN^۶)، افزایش فیلوکرون^۷، افزایش تعداد روز تا مرحله سنبله دهی و سایر عوامل موثر بر طول دوره رویشی میسر گردد به طوری که عدم تأمین نیازهای مذکور از طریق طولانی نمودن دوره رویشی مانع از ورود گیاه به مراحل حساس زایشی شده و بقاء گیاه را در برابر سرمای شدید زمستان را تضمین می کنند. چنین مکانیزمی تحت عنوان فرضیه تنظیم نمودی^۸ مطرح بوده و باعث می شود تا گیاهان بتوانند رشد و چرخه رویشی و زایشی خود را متناسب با تغییرات فصل کنترل نمایند (Mahfoozi et al., 2006; Fowler et al., 2001; Limin) (& Fowler, 2006).

به نظر می رسد بیان ژنهای القاء شونده در اثر دمای پایین بصورت نمودی تنظیم می شود به گونه ای که با تکمیل بهاره سازی (Fowler et al., 1996; Sassani et

al., 2009) و تأمین نیاز فتوپریودی (Mahfoozi et al., 2000) و ورود به مرحله زایشی بیان این ژنها به شدت کاهش می یابد. بطور کلی تأخیر در انتقال از مرحله رویشی به زایشی موجب افزایش تحمل در برابر دمای پایین می گردد. این امر احتمالاً حاکی از آنست که ژنهای نمودی^۹ طول دوره بیان ژنهای ساختاری القاء شونده در اثر دمای پایین را تعیین می کنند حال آنکه میزان حصول تحمل سرما از طریق اختلافات ژنوتیپی مرتبط با پتانسیل مقاومت در برابر سرما^{۱۰} تعیین می شود (Fowler & Limin, 2004).

با وجودی که بررسی عکس العمل گیاهان در برابر تنش سرمایی در سطح DNA و RNA (ژنومیکس و ترانسکریپتومیکس) اطلاعات مهمی را در زمینه های فرآیندهای دفاعی فراهم آورده اند (Fowler & Thomoshow, 2002)، ولی مشخص شده است که سطوح رونوشتها و پروتئینها با هم همبستگی بالایی ندارند (Ideker et al., 2001) و این بدان معناست که لزوماً تمامی رونوشتها به پروتئین ترجمه نمی شوند و برخی از آنها پیش از رسیدن به ریبوزوم تجزیه می شوند. بعلاوه بسیاری از پروتئینها از طریق تغییرات پس از ترجمه^{۱۱} نظیر فسفریلاسیون، گلیکوزیله شدن^{۱۲}، یوبی کویتینه شدن^{۱۳}، Sumoylation و سایر موارد دچار تغییر و تحول می شوند (Ideker et al., 2001) که این موارد را نمی توان در مطالعات DNA و RNA پیگیری نمود. شناخت تمام پروتئینهای بیان شده (پروتئوم) در یک بافت یا اندام در یک دوره زمانی جهت درک بیولوژی سلولی یا اندام ضروری می باشد. پروتئوم وضعیت واقعی سلول یا اندام را منعکس می نماید و در واقع بعنوان پل ارتباطی مابین ترانسکریپتوم^{۱۴} و متابولوم^{۱۵} می باشد. پروتئینها بصورت مستقیم در فرآیندهای بیوشیمیایی وارد عمل می شوند و از این رو

9. Developmental genes
10. Cold-hardiness potential
11. Post-translation modification
12. Glucosylation
13. Ubiquitination
14. Transcriptome
15. Metabolome

1. Emergence
2. Vernalization saturation
3. Double ridge stage
4. Primordium
5. Developmental traits
6. Final leaf number
7. Phyllochoron
8. Developmental regulation

زایشی گیاه (از دست رفتن تحمل به سرما) تحت شرایط مزرعه ای در مناطق سرد و معتدل صورت گرفت.

مواد و روش ها

این تحقیق در شرایط مزرعه در طی سال زراعی ۱۳۸۷-۸۸ در منطقه کرج بعنوان منطقه سرد معتدل و در ایستگاه تحقیقاتی خیرآباد زنجان و نیز فیروزکوه بعنوان مناطق سرد به اجرا گذاشته شد. گندم زمستانه رقم نورستار^۶ (بسیار متحمل به سرما) با دوره بسیار طولانی نیاز به ورنالیزاسیون در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت و در ادامه پس از گزینش تاریخ های مناسب (Janmohammadi et al., 2010) در سطح ملکولی با استفاده از روش تجزیه پروتئومیکس مورد بررسی قرار گرفت.

خصوصیات محل آزمایش

مزرعه تحقیقاتی موسسه تهیه و اصلاح نهال و بذر کرج در ۴۰ کیلومتری غرب تهران قرار داشته و دارای ارتفاع ۱۳۱۲ متری از سطح دریا بوده و در ۵۰ درجه و ۵۴ دقیقه طول شرقی و ۳۵ درجه و ۵۵ دقیقه عرض شمالی قرار دارد. متوسط حداقل دمای هوا برابر ۱/۴- درجه سانتیگراد و متوسط حداکثر دما برابر ۳۵ درجه سانتیگراد و از نظر طبقه بندی اقلیمی بر حسب دما (روش کوپن) جزء مناطق سرد معتدل طبقه بندی می شود (Khajehpour, 2006). خاک محل آزمایش نیز دارای بافت لومی-رسی بود. منطقه زنجان (کوهستانی و نیمه کوهستانی و در حدفاصل بین ۴۷ درجه و ۹ دقیقه تا ۵۰ درجه و ۵۱ دقیقه طول شرقی و ۳۵ درجه و ۲۸ دقیقه تا ۳۷ درجه و ۱۵ دقیقه عرض شمالی) با ارتفاع بیش از ۱۳۰۰ متر از سطح دریا دارای زمستان های سرد و طولانی می باشد. متوسط حداقل دمای هوا در این منطقه طی سالهای مختلف کمتر از ۶/۳- درجه سانتیگراد و تعداد روزهای یخبندان آنها بیش از ۱۲۰ روز در سال است. حداقل دمای هوا در این منطقه به ۲۹/۶- می رسد. این منطقه طبق تقسیمات اقلیمی بر حسب دما (روش کوپن) جزء مناطق سرد طبقه بندی می شود

مطالعه آنها در مقایسه با مارکرهای DNA به کارکرد^۱ سلولی و خصوصیات فنوتیپی نزدیکتر می باشد.

با وجود انجام برخی مطالعات در رابطه با ارتباط صفات نموی با تحمل به انجماد در گندم (Mafoofi et al., 2001; Fowler & Limin 2004; Sassani et al., 2009) و همچنین تجزیه عکس العمل گیاه در برابر سرما در سطح پروتئومیکس تحت شرایط کنترل شده (et al., 2009; Bertini et al., 2009; Vítámvás) می رسد نتایج بدست آمده شدیداً تحت تأثیر شرایط آزمایشی بوده و در مقایسه با نتایج مزرعه ای متفاوت باشند (Gusta et al., 2005). زیرا در شرایط مزرعه ای گیاهان ممکن است با مجموعه ای از دماهای مطلوب برای سازگاری (کمتر از ۱۰ °C)، دمای پایین تر از انجماد (Herman et al., 2006) و یا دماهای نامطلوب که منجر به رفع سازگاری^۲ می گردد را بصورت متوالی تجربه نمایند و همچنین غلات زمستانه قادرند تا با فراهم آمدن دماهای مساعد (کمتر از ۱۰ °C) در طول دوره رویشی دوباره فرایند سازگار شدن را از سر بگیرد^۳ (Fowler & Limin, 2004). علاوه بر آن به نظر می رسد دماهای پایین تر از انجماد، شدت نور، چرخه گرم و سرد در شرایط مزرعه ای و تأثیر آن بر روی بیان برخی از ژنها، افت ناگهانی دما در اطراف ریشه و کاهش هدایت هیدرولیکی ریشه ها در شرایط کنترل شده و سایر عوامل اکولوژیکی نظیر پوشش برف و سوزش باد در شرایط مزرعه ای می توانند در حصول نتایج متفاوت بین مزرعه و شرایط کنترل شده تأثیر گذار باشند (Gusta et al., 2005).

تحقیق حاضر به منظور بررسی تغییرات الگوی پروتئوم و شناسایی پروتئین های سرما القایی با استفاده از روش پروتئومیکس به منظور ارتباط بین صفات نموی، صفات فیزیولوژیک و تحمل به انجماد رقم نورستار گندم نان در حین دوره عادت دهی^۴، نقطه تکمیل نیاز بهاره سازی^۵ (حداکثر میزان تحمل به انجماد) و اوایل دوره

1. Function
2. De-acclimation
3. Re-acclimation
4. Acclimation
5. Vernalization saturation point

در منطقه فیروزکوه وضعیت پروتئوم برگی رقم نورستار (زمستانه متحمل) در طی ۳ تاریخ به شرح زیر مورد ارزیابی قرار گرفت.

T2: ۲۴ آذر ماه: حداکثر تحمل به انجماد گیاهان و بلافاصله بعد از برداشت در شرایط مزرعه ای تمامی گیاهان در مرحله رویشی بودند.

T3: ۲۶ بهمن ماه: کاهش میزان تحمل به انجماد در مقایسه با مرحله قبلی که با ورود گیاهان به مرحله زایشی همراه بود.

T4: ۱۸ فروردین ماه: ادامه روند کاهش تحمل به انجماد با پیشرفت مراحل زایشی.

رسوب دادن و استخراج پروتئین ها

برگهای سبز و توسعه یافته گیاه در مزرعه بریده شد و پس از قرار دادن در پوشش آلومینیومی بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد گردید. به منظور استخراج پروتئینها برای هر یک از تیمارها ۱ گرم برگ درون هاون چینی حاوی نیتروژن مایع کوبیده شد و پودر حاصله به فالكون های ۱۵ میلی لیتری انتقال داده شد و ۱۰ میلی لیتر محلول استخراج^۱ TCA سرد (۱۰ گرم TCA و ۰/۰۷ گرم DTT^۲ و تا رسیدن به ۱۰۰ میلی لیتر استون اضافه گردید) به آن اضافه شد. فالكون ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای 20°C قرار داده شدند و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 4°C و با سرعت ۱۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ، فالكون ها خارج شده و سریعاً داخل یخ قرار داده شدند و پس از دور ریختن محلول بالای پلت باقی مانده در فالكون ها با کمک سوزن خرد گردید و در ادامه ۱۰ میلی لیتر محلول شستشو سرد (۰/۰۷ گرم DTT و تا رسیدن به ۱۰۰ میلی لیتر استون اضافه گردید) به هر فالكون اضافه شد و فالكون ها به مدت یک ساعت در دمای 20°C قرار داده شدند. در ادامه فالكون ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 4°C و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و پس از اتمام سانتریفیوژ محلول بالای دور ریخته شد و مجدداً مرحله شستشو پلت تا ۳ بار انجام گردید. پس از آخرین

(Khajepour, 2006). سرمای شدید زمستان در برخی از سالها و نیز سرمای اوایل بهار یکی از عوامل اصلی محدود کننده تولید گندم در این استان می باشد. منطقه فیروزکوه در شمال شرق تهران (طول جغرافیایی ۵۲ درجه و ۴۶ دقیقه و عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۲۸ دقیقه) جزء مناطق بسیار سرد با زمستان طولانی می باشد.

رقم مذکور در نیمه اول مهرماه بطور همزمان در سه منطقه کشت گردید. جهت بررسی ارتباط تحمل به انجماد با صفات فنولوژیکی در دو منطقه کرج و زنجان طی ۵ دوره عادت دهی شامل ۱۴ آبان، ۳ آذر، ۳۰ آذر، ۳۰ دی و ۴ اسفند نمونه برداری گردید. در منطقه فیروزکوه تاریخ های نمونه برداری این منطقه شامل ۲۴ آذرماه، ۲۶ بهمن ماه و ۱۸ فروردین ماه بود.

تیمارهای انتخاب شده برای تجزیه از طریق الکتروفورز دو بعدی

نمونه های انتخاب شده با توجه به نتایج روند تحمل به انجماد (LT_{50}) و تشریح طوقه برای بررسی مرحله نمو مریستم نوک ساقه صورت گرفت. در مناطق زنجان و کرج برگهای سبز و کاملاً توسعه یافته رقم گندم نورستار (زمستانه متحمل به سرما)، در طی سه تاریخ نمونه برداری همراه شاهد به شرح ذیل برای تجزیه پروتئوم مورد استفاده قرار گرفتند.

T1: ۳ آذرماه، که گیاهان در اوایل دوره عادت دهی به سرما قرار داشته و ارقام متحمل و نیمه متحمل شروع به افزایش تحمل به انجماد کرده بودند. در این مرحله تمامی گیاهان در مرحله رویشی قرار داشتند.

T2: ۳۰ آذرماه، گیاهان در این مرحله از نمونه برداری در اوج تحمل به سرما قرار داشتند و با وجودی که نیاز بهاره سازی ارقام نیمه متحمل فراهم شده بود ولی تشریح مریستم نوک ساقه بلافاصله پس از برداشت از مزرعه حاکی از باقی ماندن آنها در مرحله رویشی (برجستگی دوگانه) به دلیل بازداری ناشی از سرما بود.

T3: ۳ اسفندماه، در این مرحله از نمونه برداری تحمل به انجماد گیاهان در مقایسه با مراحل قبلی کاهش یافته بود و ورود تمامی گیاهان به مرحله زایشی کاملاً مشهود بود.

شاهد: گیاهان کشت شده در شرایط کنترل شده که مرحله نمو آنها مشابه گیاهان در T1 بود.

1. Trichloroacetic acid

2. Dithiothreitol

Progenesis Samespot (Nonlinear Dynamics) استفاده گردید. مقایسات در هر یک از مناطق تنها بین تاریخ های نمونه برداری صورت گرفت. پس از انجام مقایسات داده های مرتبط با حجم و تراکم لکه ها استخراج شده و پس از محاسبه انحراف استاندارد، T-test برای هر یک از مقایسات انجام گردید و تعداد لکه های که در سطح آماری ۱۰ درصد دچار تغییرات شده بودند مشخص گردید.

شناسایی پروتئین ها از طریق روش طیف

سنجی جرمی^۴

برای شناسایی پروتئین از انگشت نگاری جرم پپتید^۵ استفاده گردید که برای این منظور ابتدا روش Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF) MS (Bruker Daltonics) مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه برای لکه های که با روش مذکور شناسایی نشده بودند روش Liquid Chromatography-Electrospray Ionization (LC-ESI) MS/MS (Waters) و مطابق دستورالعمل پیشنهادی (Amme et al (2006) مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

تجزیه پروتئوم در مناطق و تاریخ های گزینش شده

الف) بررسی تغییرات افزایشی و کاهشی رقم

زمستانه نورستار طی تاریخ های نمونه برداری در مناطق مختلف

نورستار در منطقه کرج

مقایسات صورت گرفته در کرج شامل T1 در برابر شاهد، T2 در برابر T1 و T3 در برابر T2 بود. نتایج اولیه نشان داد که در این منطقه بیشترین میزان تغییرات در مقایسه T1 در برابر شاهد با ۱۹۰ لکه تغییر یافته بود که از بین آنها ۱۲۹ لکه دچار تنظیم افزایشی و ۶۱ لکه دچار تنظیم کاهشی شده بودند (شکل ۱).

شستشو و دور ریختن محلول بالای پلت، دهانه فالكون با کمک سلفون پوشانده شد و سپس با استفاده از سوزن سوراخ های ریزی در روی سلفون ایجاد گردید. فالكون ها به درون دستگاه خشک کننده انجمادی^۱ انتقال داده شده و در دمای -40°C به مدت ۶ ساعت خشک گردید. فالكون های حاوی پلت خشک جهت استفاده بعدی در فریزر -80°C نگاهداری شدند.

تعیین غلظت پروتئین در نمونه ها با استفاده از

2-D Quant Kit

کیت های 2-D Quant (GE Healthcare/Amersham) کیت های 2-D Quant (Biosciences, Freiburg, Germany) حاوی تمام محلول های لازم جهت تعیین غلظت پروتئین ها می باشد که آنها عبارتند از: محلول استاندارد BSA، محلول Colour A و Colour B، محلول precipitant، محلول co-precipitant و محلول copper. میزان جذب از طریق دستگاه اسپکتروفوتومتر (UVIKON-930, Italy) در طول موج ۴۸۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد میزان غلظت پروتئین در نمونه برآورد گردید. در صورتی که ضریب تبیین منحنی استاندارد کمتر از ۰/۹۹ بود اندازه گیری مجدداً تکرار گردید. غلظت پروتئین اندازه گیری شده در هر یک از تیمارها و میزان عصاره مورد نیاز برای انجام بعد اول الکتروفورز در جدول ۱ آمده است.

بعد اول الکتروفورز (Isoelectric focusing) و

بعد دوم الکتروفورز (SDS-PAGE)

این دو روش با استفاده از روش Amme et al (2005) انجام گرفت.

رنگ آمیزی ژل ها^۲

رنگ آمیزی ژل ها طبق روش Kang et al (2002) و با استفاده از کوماسی^۳ (CBB G250) صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل تصاویر ژل های دو بعدی

پس از اسکن تصاویر جهت تجزیه و تحلیل لکه ها و شناسایی تغییرات موجود بین تیمار ها از نرم افزار

4. Identification of Proteins by Mass Spectrometry (MS)

5. Peptide Mass Fingerprint

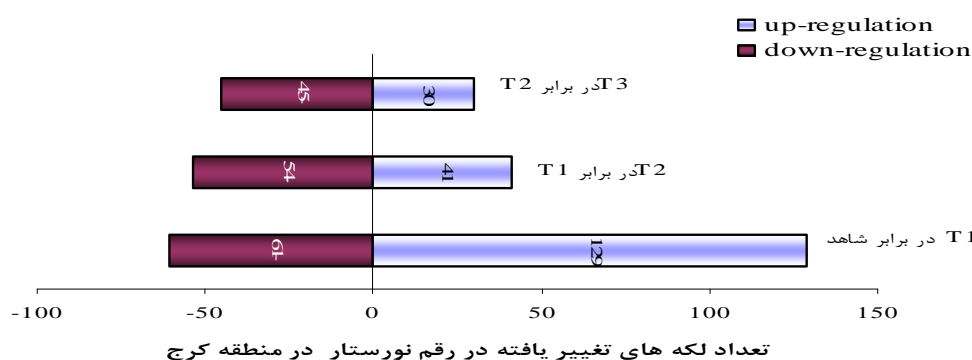
1. Freeze dryer- lyophilizer

2. Gel staining

3. Commassie Brilliant Blue

جدول 1- غلظت پروتئین در نمونه های برداشت شده گندم در مناطق و تاریخ های مختلف

| رقم | منطقه | تاریخ | غلظت پروتئین برحسب میکروگرم بر میکرولیتر | میزان عصاره استخراجی حاوی 150 میکروگرم پروتئین (میکرولیتر) | مقدار مورد نیاز از بافر RH-A جهت رساندن حجم به 250 میکرولیتر |
|---------|----------|------------|--|--|---|
| نورستار | کرج | 2 آذر | 1/02 | 147 | 103 |
| نورستار | کرج | 30 آذر | 1/11 | 135 | 115 |
| نورستار | کرج | 2 اسفند | 1/95 | 77 | 173 |
| نورستار | زنجان | 2 آذر | 3/35 | 45 | 205 |
| نورستار | زنجان | 30 آذر | 1/69 | 89 | 161 |
| نورستار | زنجان | 2 اسفند | 1/82 | 82 | 168 |
| نورستار | فیروزکوه | 23 آذر | 1/46 | 103 | 147 |
| نورستار | فیروزکوه | 25 بهمن | 1/66 | 90 | 160 |
| نورستار | فیروزکوه | 18 فروردین | 1/7 | 88 | 162 |



شکل 1- تعداد لکه های تغییر یافته در طی مقایسات انجام شده در رقم نورستار در منطقه کرج

اختصاص داده بودند. پروتئین های مذکور در فرایند اکسیداسیون/احیاء فتوسنتزی، کاتالیز بیوسنتز برخی از متابولیت های ثانویه و برخی مواد آلوشیمیایی¹ نظیر DIBOA (1567)، فتوسنتز، عکس العمل به سرما و محرک های نوری (1398)، گلیکولیز (2648 و 1359) و نسخه برداری (2685) نقش دارند.

آنزیم RuBisCO activase جهت تشکیل کاربامات (اتصال CO₂ به اسید آمینه لایسین در جایگاه فعال آنزیم رویسکو) ضروری می باشد. همچنین این آنزیم

بررسی لکه ها در کرج در مقایسه T1 با شاهد نشان داد که لکه های 2649 (لکه شناسایی نشده با 3/1 برابر افزایش)، 1567 (Cytochrome P450-like)، با 2/31 برابر افزایش) 1398 (ribulose-1,5-bisphosphate) برابر افزایش)، با 2/25 برابر افزایش)، 1043 (carboxylase activase، با 2/21 برابر افزایش)، 2648 (پروتئین نامگذاری نشده، با 2/21 برابر افزایش)، 2648 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) با 2/09 برابر افزایش)، 1359 (Fructose-bisphosphate) با 2/03 برابر افزایش) و 2685 (AP2) domain transcription factor، با 2 برابر افزایش) به ترتیب بیشترین میزان تغییرات افزایشی را به خود

1. Wheat allelochemical DIBOA

قسمتهای تحتانی غلاف برگ را با تکنیک تجزیه لکتین بلات^۱ مورد بررسی قرار دادند (Komatsu *et al.*, 2009). مشابه با نتایج این تحقیق، پروتئین‌هایی نظیر 6-Phosphogluconate، Mitochondrial F1-ATPase، NADP dependent malic enzyme، dehydrogenase، Enolase و UDP-glucose pyrophosphorylase (که در مسیره‌های مرتبط با انرژی نقش داشتند) و Elongation factor 1 beta و RuBisCO subunit binding-protein (که در مسیر سنتز پروتئین درگیر بودند) و Heat shock protein 90 (با نقش چاپرونی) دچار تغییر شده بودند. پروتئین‌های مذکور عمدتاً مرتبط با مسیره‌های متابولیکی، تولید انرژی و متابولیسم اولیه بودند که این حاکی از آنست که احتمالاً تحت تنش سرما همئوستازی جدیدی بر مسیره‌های مذکور حاکم خواهد شد.

بررسی لکه‌ها در کرج طی انتقال از مرحله رویشی به زایشی (T3 در برابر T2) نشان داد که لکه ۱۱۰۸ (UDP-glucose pyrophosphorylase) با ۱۸۳ درصد افزایش) بیشترین میزان افزایش را به خود اختصاص داده بود این در حالی بود این لکه در طی افزایش تحمل به انجماد (T1 به T2) بطور چشمگیری کاهش یافته بود. علاوه بر آن لکه‌های ۱۵۶۰ (protein F22G5.34) با ۱/۷۷ برابر افزایش)، ۱۰۷۲ (E3 ubiquitin ligase) با ۱/۵۷ برابر افزایش)، ۱۴۸۰ (chloroplast، با ۱/۴۴ برابر افزایش) و ۹۹۴ (RuBisCO) با large subunit-binding protein subunit alpha (۱/۳۸ برابر افزایش) بیشترین میزان تنظیمات افزایشی را به خود اختصاص داده بودند.

در این مرحله لکه‌های ۲۵۱۱ (NBS-LRR) disease resistance protein، با ۵۲ درصد کاهش)، ۲۴۱۰ (Serpin) با ۵۲ درصد کاهش، شکل ۴-۲۸)، ۱۴۰۱ (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase) با ۴۷ درصد کاهش)، ۱۴۴۸ (glycerol-3-)، ۴۶ درصد کاهش) و

برای بازداری برخی بازدارنده رقابتی نظیر 2-Carboxy-D-arabitol 1-phosphate برای جایگاه فعال آنزیم روبیسکو ضروری می‌باشد.

در رقم مذکور لکه‌های ۲۴۹۰ (شناسایی نشده) با ۷۷ درصد کاهش)، ۱۶۹۰ (شناسایی نشده) با ۷۰ درصد کاهش)، ۱۳۹۰ (Adenosine kinase-like protein)، ۲۳۵۱ (metal ion transmembrane transporter)، با ۴۷ درصد کاهش) و ۲۶۸۹ (UDP-glucuronate)، با ۴۵ درصد کاهش) بیشترین میزان تغییرات کاهشی را نشان دادند. این پروتئین‌ها در فرایندهای مصرف مجدد ریبونوکلئوزید پورین (۱۳۹۰) و انتقال یونها (۲۳۵۱) نقش دارند. آنزیم UDP-glucuronate decarboxylase فرایند زیر را کاتالیز می‌نماید و در فرایندهای متابولیکی درون سلولی نقش دارد.

$$\text{UDP-D-glucuronate} \rightleftharpoons \text{UDP-D-xylose} + \text{CO}_2$$

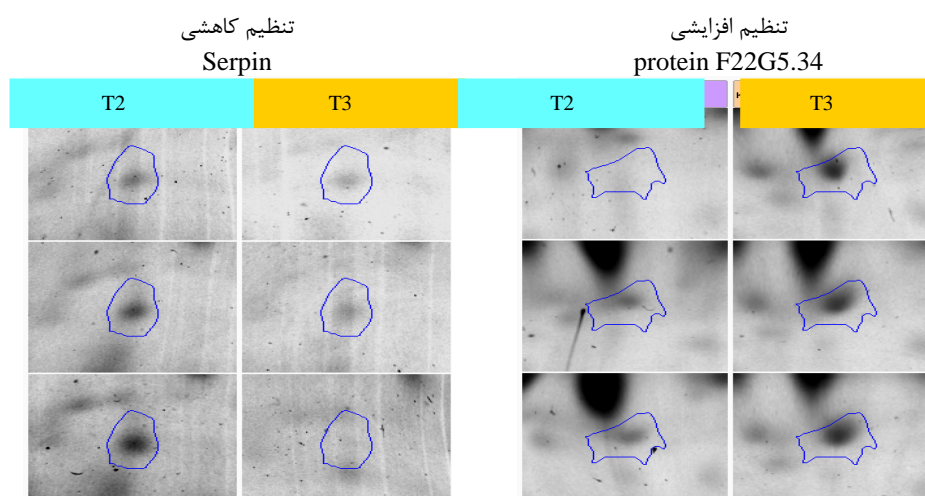
بررسی لکه‌ها در این رقم طی انتقال از مرحله T1 به T2 حاکی از آن بود که لکه‌های ۱۱۷۲ (شناسایی نشده) با ۲/۶۲ برابر افزایش)، ۲۶۹۰ (cell-autonomous) heat shock cognate protein 70، با ۱/۶۳ برابر افزایش)، ۲۶۸۶ (شناسایی نشده) با ۱/۶۱ برابر افزایش)، ۱۴۴۶ (Cytochrome c)، با ۱/۵۳ برابر افزایش)، ۲۵۱۱ (NBS-LRR disease resistance protein)، با ۱/۴۸ برابر افزایش) و ۱۴۴۸ (glycerol-3-phosphate) و dehydrogenase، با ۱/۴۷ برابر افزایش) دارای بیشترین میزان تغییرات افزایشی بودند. از سوی دیگر لکه‌های ۱۱۰۸ (UDP-glucose pyrophosphorylase) با ۴۸ درصد کاهش)، ۱۴۸۰ (membrane-associated 30 kDa protein، chloroplast)، با ۴۵ درصد کاهش)، ۱۵۱۰ (ribosomal protein S11) با ۴۲ درصد کاهش)، ۲۰۳۰ (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) با ۳۳ درصد کاهش)، ۲۰۳۵ (UDP-glucose:glycoprotein) با ۳۲ درصد کاهش) بیشترین میزان کاهش را نشان دادند. در گیاه برنج پس از قرار دادن گیاهچه‌های ۲ هفته‌ای در معرض دمای ۵°C به مدت ۴۸ ساعت تغییرات در نحوه بیان پروتئین‌ها در

1. Lectin blot analysis

اندوپلاسمیک به حالت چسبیده به غشاء سلول در می آید و در پایان هسته به چندین قسمت شکسته می شود (Belkhadir et al., 2004). با توجه به شدت سرما در مرحله T2 و صدمات ناشی از آن به نظر می رسد که گیاه برای کاهش هزینه های نگهداری برخی از قسمت ها را با این فرایند از بین می برد و در ادامه پس از عبور به مرحله زایشی و مساعد شدن شرایط جوی بیان این پروتئین کاهش می یابد. با وجود افزایش دما در طی این عبور از مرحله رویشی به زایشی بیان روبیسکو اکتیواز کاهش یافت با توجه به چند کاره بودن این پروتئین به نظر می رسد برخی از ایزوفرم های آن نقش مهمی در عکس العمل به سرما داشته باشند.

۱۴۴۶ (Cytochrome c)، با ۴۲ درصد کاهش) دارای بالاترین میزان تغییرات کاهشی بودند (شکل ۲). با وجودی که با رسیدن به مرحله حداکثر تحمل به انجماد بیان NBS-LRR disease resistance protein (۲۵۱۱) افزایش یافته بود، با عبور از مرحله رویشی به زایشی بیان آن کاهش یافت. این پروتئین در فرایند آپوپتوسیس^۱ که نوعی از مرگ برنامه ریزی سلولی می باشد نقش دارد و در طی آن سیتوپلاسم تغلیظ می گردد و کروماتین هسته در اطراف هسته قرار می گیرند و میتوکندری ها و ریبوزوم ها فشرده می شوند و شبکه

¹ apoptosis



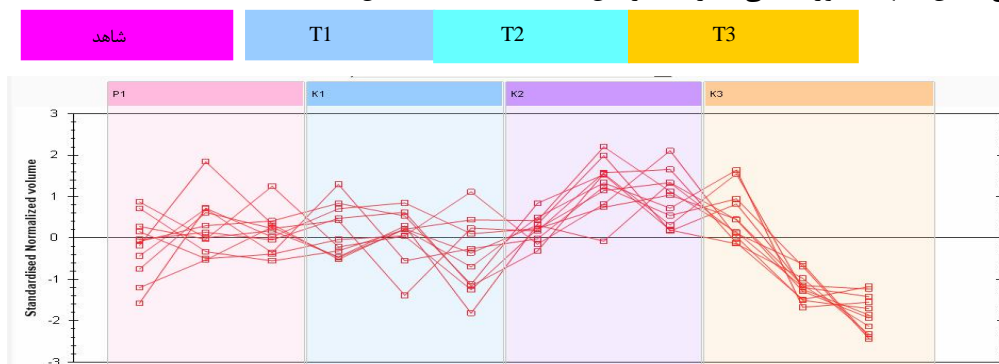
شکل ۲- نمونه ای از تنظیم افزایشی و کاهشی در رقم نورستار در منطقه کرج طی انتقال از مرحله حداکثر تحمل انجماد (T2) به مرحله آغاز رشد زایشی (T3). شکل ها بیانگر سه تکرار از هر نمونه هستند.

(universal stress protein 9303, response to chloroplast fructose-)، ۲۲۸۰ و ۱۴۴۲ (stress bisphosphate aldolase)، بخش اعظمی از پروتئین های مذکور در کلروپلاست جای دارند که این به اهمیت این اندامک در افزایش تحمل به انجماد اشاره دارد.

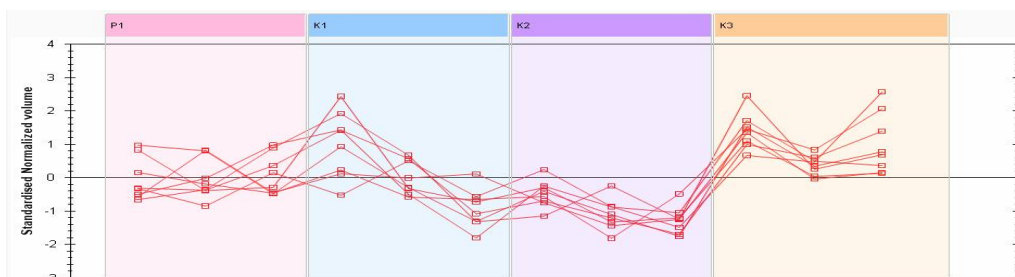
همچنین بررسی بیان لکه های ۱۶۴، ۱۱۵۴ (Nuclear cap-binding protein)، ۴۸۸ (DNAhelicase, putative)، ۷۰۴، ۷۸۵، ۱۶۵، ۱۶۶ و ۱۳۸۸ حاکی از آن بود که بیان این پروتئین ها در طی عادت دهی به سرما (T1) و نقطه اشباع نیاز بهاره سازی (T2) کاهش یافته و در ادامه با شروع رشد

بررسی الگوی بیان لکه ها در رقم نورستار-کرج بر اساس نمودارهای دندوگرام نشان داد که بیان ۱۱ لکه در طی شاهد و T1 روند نسبتاً ثابتی داشته و با رسیدن به مرحله حداکثر تحمل به انجماد (T2) بیان آنها افزایش یافته و پس از این مرحله نیز با شروع رشد زایشی بیان آنها بطور معنی داری کاهش یافت (شکل ۳). لکه های مذکور شامل ۲۱۸۸، ۲۰۶۵، ۱۴۰۷ (Photosystem II؛ ۲۶۷۰ (subunit of 23 kDa)، (oxygen evolving system of photosystem II)، ۲۶۵۶ (cp31BHv)، ۱۹۸۹، ۲۱۵۴ (Ribulose-phosphate 3-)، ۱۵۱۲ (epimerase, chloroplast precursor)، ۱۰۵۱ (Putative chloroplast ribosomal protein L1)

زایشی بیان آنها بطور معنی داری افزایش یافتند (شکل ۴).



شکل ۳- الگوی بیان برخی از پروتئین ها (۲۰۶۵، ۲۱۸۸، ۱۴۰۷، ۲۶۷۰، ۲۶۵۶، ۱۹۸۹، ۲۱۵۴، ۱۵۱۲، ۱۰۵۱، ۲۲۸۰، ۱۴۴۲) در رقم نورستار در منطقه کرج . بیان این پروتئین ها در نقطه حداکثر تحمل به انجماد افزایش یافتند و با آغاز رشد زایشی دچار تنظیمات کاهشی شدند.

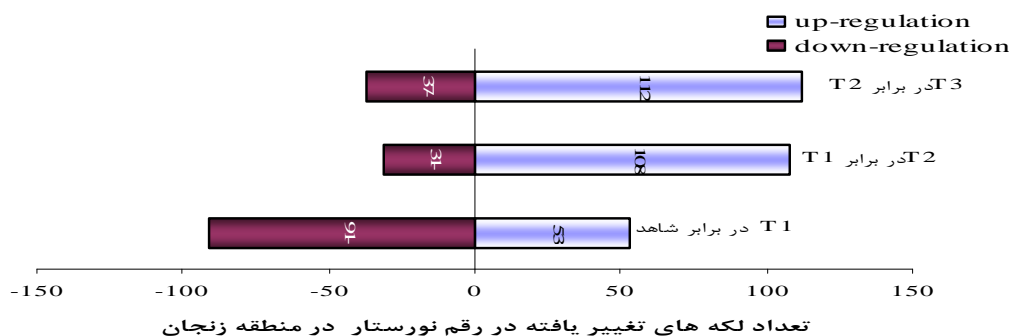


شکل ۴- الگوی بیان برخی از پروتئین ها (۱۱۵۴، ۱۶۴، ۴۸۸، ۷۰۴، ۷۸۵، ۱۶۵، ۱۶۶، ۱۳۸۸) در رقم نورستار در منطقه کرج . بیان این پروتئین ها در حین عادت دهی به سرما و نقطه حداکثر تحمل به انجماد کاهش یافته بودند و آغاز رشد زایشی دچار تنظیمات کاهشی شدند.

تغییرات در مقایسه T3 در برابر T2 با ۱۴۹ لکه تغییر یافته بود که از بین آنها ۱۱۲ لکه دچار تنظیم افزایشی و ۳۷ لکه دچار تنظیم کاهشی شده بودند (شکل ۵).

نورستار در منطقه زنجان

مقایسات صورت گرفته در زنجان مشابه کرج شامل T1 در برابر شاهد، T2 در برابر T1 و T3 در برابر T2 بود. نتایج اولیه نشان داد که در این منطقه بیشترین میزان



شکل ۵- تعداد لکه های تغییر یافته در طی مقایسات انجام شده در رقم نورستار در منطقه زنجان

RuBisCO large subunit-binding) ۹۹۳ (برابر، ۱/۸۶ protein subunit beta, chloroplastic، با ۱/۷۶ برابر) و ۷۹۷ (HSP70، با ۱/۷۵ برابر) بیشترین تغییرات افزایشی را به خود اختصاص داده بودند. افزایش بیان چپرون های شوک حرارتی و زیر واحد بتا آنزیم روبیسکو که نقش آنها پیش تر در تنش های محیطی نمایان شده از جمله نکات قابل توجه این مقایسه می باشد (شکل ۶). همچنین بیان لکه ۲۶۹۰ (cell-autonomous heat shock cognate protein 70) نیز در منطقه کرج در مقایسه مشابه افزایش معنی داری را نشان داد که بیانگر اهمیت چپرون های شوک حرارتی در بهبود تاخوردگی پروتئین ها در حین افزایش تحمل به انجماد می باشد. در طی مقایسه فوق لکه های ۱۹۹۲ (با ۷۰ درصد)، ۱۹۳۲ (protein At2g37660, chloroplast، با ۶۶ درصد)، ۲۰۶۵ (با ۶۳ درصد)، ۱۹۹۹ (Peroxidase N (Neutral peroxidase) precursor، با ۴۹ درصد)، ۲۵۱۱ (putative NBS-LRR disease resistance، با ۴۷ درصد)، ۲۴۳۷ (WD-40 repeat، با ۳۸ درصد) و ۲۳۳۸ (protein-like Aconitate hydratase cytoplasmic، با ۳۶ درصد) دارای بالاترین میزان کاهش در بین لکه های کاهش یافته بودند. پروتئین Aconitate hydratase بصورت مشابه در هر دو منطقه زنجان و کرج دچار تنظیم کاهشی شده بود. با وجودی که بیان پروتئین NBS-LRR disease resistance که در فرایند آپوپتوسیس نقش دارد در منطقه کرج افزایش یافته بود و در مقابل در همان تاریخ بیان پروتئین مذکور در منطقه زنجان کاهش یافته بود. احتمالاً این امر حاکی از آن است که پروتئین های درگیر در فرایند بهبود تحمل به انجماد و یا حتی مکانیزیم های مربوطه نیز در دو منطقه تا حدودی متفاوت می باشند.

مقایسه تغییرات بیان لکه ها در طی انتقال از مرحله رویشی به زایشی (T3 در برابر T2) حاکی از بود که بیان لکه های ۲۴۰۸ (با ۱۹/۴۲ برابر)، ۲۴۸۱ (cyclin dependent protein kinase، با ۱۲/۶۸ برابر)، ۱۹۹۲ (mitochondrial ATP synthase، با ۳/۹۲ برابر)، ۲۱۰۲ (undecaprenyl precursor، با ۳/۱۲ برابر)، ۲۲۶۵ (diphosphate synthase, putative، با ۳/۰۶ برابر)،

مقایسه پروتئوم رقم نورستار-زنجان در مرحله T1 با شرایط شاهد نشان داد که لکه های ۵۵۱ (با ۲/۶۲ برابر)، ۵۲۵ (electron transporter, putative، با ۲/۳۶ برابر)، ۱۰۵۲ (Cysteine synthase, putative، با ۱/۹۶ برابر)، ۲۶۸۵ (putative AP2 domain transcription factor، با ۱/۸۴ برابر)، ۴۶۵ (glycine decarboxylase P subunit، با ۱/۷۷ برابر)، ۱۳۵۷ (Putative fructose-bisphosphate aldolase، با ۱/۶۹ برابر)، ۱۵۶۷ (Cytochrome P450-like، با ۱/۶۸ برابر) و لکه ۲۶۴۸ (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase، با ۱/۵۹ برابر) بیشترین میزان افزایش را دارا بودند. شایان ذکر است که پروتئین های putative AP2 domain transcription factor، Cytochrome P450-like و glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase در منطقه کرج نیز در مقایسه مشابه تغییرات افزایشی محسوسی را نشان دادند. در طی این مقایسه مشخص گردید لکه های ۲۴۰۸ (با ۷۳ درصد)، ۲۴۵۳ (chromatin remodeling complex subunit، با ۶۶ درصد)، ۲۱۹۹ (Oxygen-evolving enhancer، با ۶۲ درصد)، ۲۴۳۷ (protein 2, chloroplastic metal، با ۶۰ درصد)، ۲۳۵۱ (40 repeat protein-like، با ۶۰ درصد)، ۱۸۲۷ (ion transmembrane transporter، chloroplast oxygen-evolving enhancer protein 1، با ۵۸ درصد) و لکه ۲۳۳۸ (Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic، با ۵۷ درصد) بیشترین میزان تنظیمات کاهشی را دارا می باشند. پروتئین های مذکور در قسمت های ساختاری مرتبط با واکنش نوری فتوسنتز، بازداری نوری، رونویسی و انتقال یون نقش دارند. ناقل غشایی یونهای فلزی (۲۳۵۱) بطور مشترک در هر دو منطقه کرج و زنجان در طی مقایسه مذکور کاهش چشمگیری را نشان داد.

مقایسه مرحله حداکثر تحمل به انجماد (T2) با مرحله عادت دهی به سرما (T1) نشان داد که پروتئین های ۱۳۴۱ (Boron transporter، با ۳/۴۴ برابر)، ۲۶۹۰ (cell-autonomous heat shock cognate protein 70، با ۲/۴۰ برابر)، ۷۸۵ (با ۲/۲۹ برابر)، ۹۶۱ (Protein disulfide-isomerase، با ۲/۱۵ برابر)، ۲۶۸۵ (Cell division protease ftsH homolog 2, chloroplastic،

23 kDa subunit of oxygen) ۲۱۹۹، (isomerase evolving system of photosystem II Plastid-specific 30S ribosomal protein 2,) ۲۲۰۴، (chloroplast precursor transcription factor) ۲۲۶۷، (Aconitate hydratase cytoplasmic) ۲۳۳۸، (Dp (metal ion transmembrane transporter) ۲۳۵۱، (WD-40 repeat protein-like,) ۲۴۳۷ و ۲۷۰۴ (Putative plastidic cysteine synthase) اشاره داشت.

همچنین الگوی بیان ۲۵ لکه در رقم نورستار در منطقه زنجان مشابه روند تحمل به انجماد بود به طوری که در مرحله T2 بیان آنها به حداکثر ممکن رسید و با شروع رشد زایشی مجدداً بیان آنها کاهش یافت (شکل ۸).

از میان این لکه های می توان به پروتئین های شناسایی شده نظیر لکه شماره ۹۱۰ (RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplast Aldehyde dehydrogenase like) ۹۳۶، (precursor protein) ۹۵۹ (ferulate-5-hydroxylase)، ۹۹۳ (RuBisCO large subunit-binding protein subunit) (beta, chloroplast binding protein subunit alpha, chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase) ۱۳۹۸ (activase ribulose-1,5-bisphosphate) ۱۴۰۱، (carboxylase activase cytosolic malate) ۱۴۱۹، (dehydrogenase (Ps16 protein) ۱۴۲۳، (chloroplast fructose-bisphosphate aldolase) ۲۱۴۴ (Regulator of chromosome) (condensation/beta-lactamase-inhibitor protein II Putative 20 kDa chaperonin, chloroplast) ۲۱۹۰ و ۲۷۰۳ (maturase K) اشاره داشت که از بین آنها زیر واحد بتا آنزیم روبیسکو در فرایندهای همچون مرگ سلولی، تاخوردگی پروتئین ها، عکس العمل به سرما و مقاومت اکتسابی ایفای نقش می کند. زیر واحد آلفای آنزیم روبیسکو دارای فعالیت چپرونی بوده و در تاخوردگی پروتئین ها وارد عمل می شود.

آنزیم روبیسکو اکتیواز که بیان ایزوفرم های متعددی از آن از روند مذکور تبعیت می کنند علاوه بر نقش آنها

۱۳۵۹ (Fructose-bisphosphate aldolase) ۲/۷۳ برابر،) ۱۹۳۲ (protein At2g37660, chloroplast) ۲۴۳۷ (WD-40 repeat) ۲/۶۸ برابر،) ۲۳۳۸ (Aconitate) ۲/۶۰ برابر) و ۲۳۳۸ (Aconitate hydratase cytoplasmic) ۲/۵۹ برابر) بیشترین میزان افزایش را در بین تمامی لکه ها دارا بودند. پروتئین های مذکور در فسفریلاسیون پروتئین ها (مسیرهای سیگنال دهی)، سنتز ATP، انتقال یونهای هیدروژن از عرض غشاء، شکل سلول، تشکیل و تجزیه دیواره سلولی، سنتز پپتیدیل گلیکان ها، گلیکولیز، نسخه برداری و فرایندهای متابولیکی درون سلولی نقش دارند.

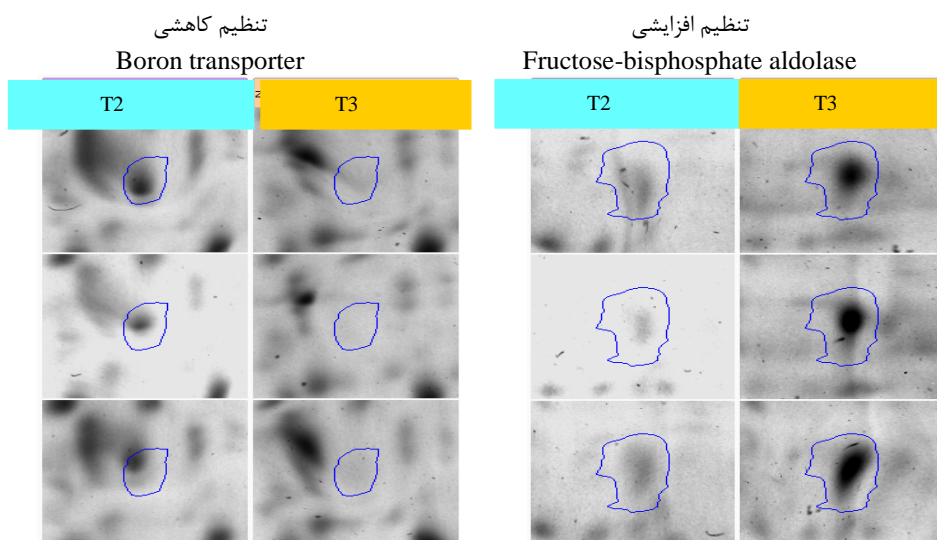
با انتقال از مرحله رویشی به زایشی بیان لکه های ۱۳۴۱ (Boron transporter)، تا ۷۱ درصد، (شکل ۶)، ۱۰۴۳ (تا ۵۲ درصد)، ۱۰۴۱ (تا ۴۶ درصد)، ۲۶۹۰ (cell-autonomous heat shock cognate protein 70) تا ۴۵ درصد، ۱۰۵۸ (CDK activating kinase)، تا ۴۲ درصد) و ۱۳۳۵ (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activase) تا ۳۷ درصد) کاهش نشان دادند.

بررسی الگوی بیان لکه ها در رقم نورستار در منطقه زنجان نشان داد که بیان ۳۶ پروتئین با افزایش تحمل به انجماد در مرحله T1 کاهش یافت و با رسیدن به حداکثر تحمل به انجماد بیان این لکه ها به حداقل رسید و با شروع رشد زایشی مجدداً افزایش نشان دادند (شکل ۷).

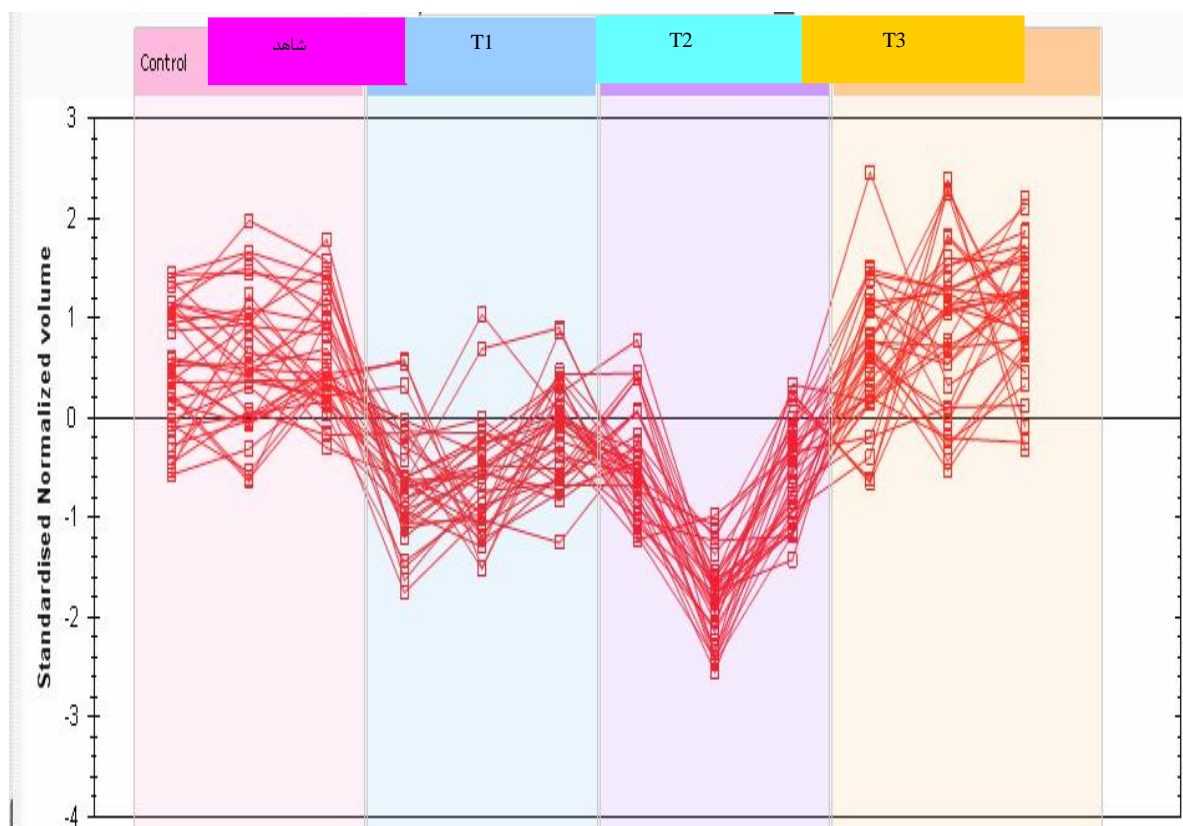
از جمله آنها می توان به لکه های شناسایی شده ۱۲۳۵ (Putative cell survival CED-4-interacting) (protein MAC-1 CARAB-AK-LYS;) ۱۵۰۳، (amino acid binding / aspartate kinase Putative) ۱۵۱۲، (ribosomal protein S11) ۱۵۶۰، (chloroplast ribosomal protein L1 Oxygen-evolving enhancer) ۱۸۲۵، (F22G5.34 chloroplast oxygen-evolving) ۱۸۲۷، (protein 1 Adenylate cyclase -) ۱۹۶۰، (enhancer protein 1 mitochondrial ATP) ۲۱۰۲، (Glomerella lagenarium triosephosphat-) ۲۱۶۲، (synthase precursor

تحریک بیان پروتئین Ps16 را در گندم در حین عادت دهی به سرما گزارش نموده بودند.

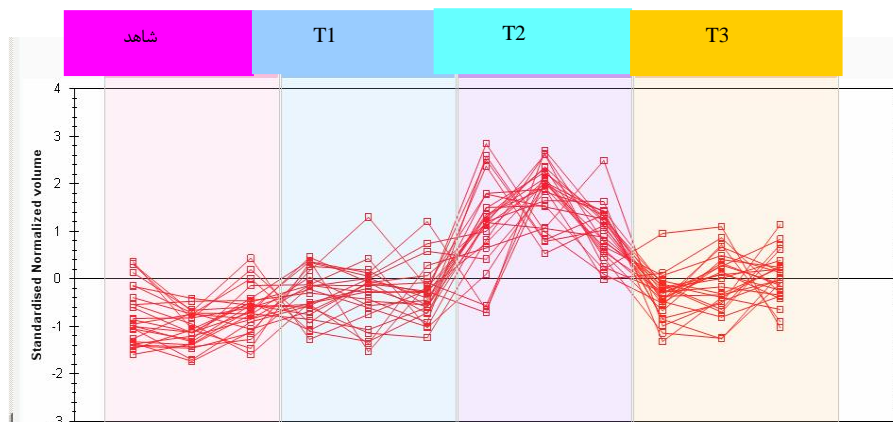
در فتوسنتز در عکس العمل به سرما و نور نیز حائز اهمیت می باشد. پیش تر (Vítámvás *et al* 2007) نیز



شکل ۶- نمونه ای از تنظیم افزایشی و کاهشی در رقم نورستار در منطقه زنجان طی انتقال از مرحله حداکثر تحمل انجماد (T2) به مرحله آغاز رشد زایشی (T3). شکل ها بیانگر سه تکرار از هر نمونه هستند.



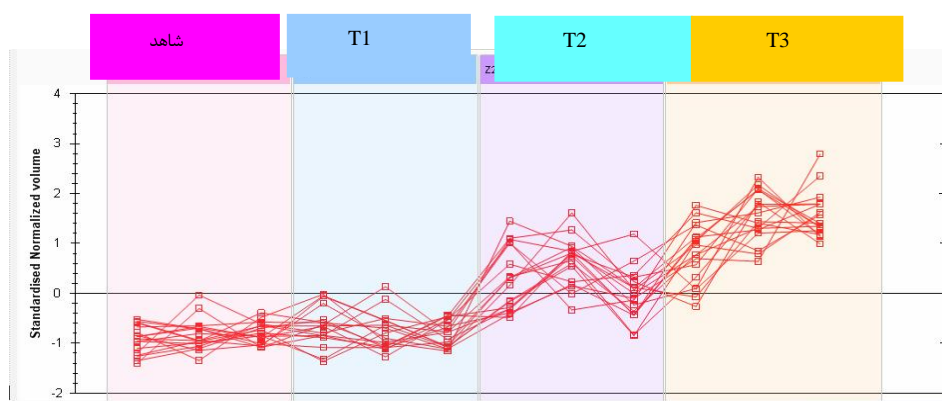
شکل ۷- الگوی بیان برخی از پروتئین ها در رقم نورستار (۱۲۳۵، ۱۵۰۳، ۱۵۱۰، ۱۵۱۲، ۱۵۶۰، ۱۸۲۵، ۱۸۲۷، ۱۹۶۰، ۲۱۰۲، ۲۱۶۲، ۲۱۹۹، ۲۲۰۴، ۲۲۶۷، ۲۳۳۸، ۲۳۵۱، ۲۴۳۷، ۲۷۰۴) در منطقه زنجان. بیان این پروتئین ها در حین عادت دهی به سرما و نقطه حداکثر تحمل به انجماد کاهش یافته بودند و آغاز رشد زایشی دچار تنظیمات کاهشی شدند.



شکل ۸- الگوی بیان برخی از پروتئین ها (۹۱۰، ۹۳۶، ۹۵۹، ۹۹۳، ۹۹۴، ۱۳۹۸، ۱۴۰۱، ۱۴۱۹، ۱۴۲۳، ۱۴۴۲، ۲۱۴۴، ۲۱۹۰، ۲۷۰۳) در رقم نورستار در منطقه زنجان که تا حدودی مشابه روند تحمل به انجماد در طی تاریخ های نمونه برداری بود. بیان این پروتئین ها در حین عادت دهی به سرما و نقطه حداکثر تحمل به انجماد افزایش یافته بودند و با آغاز رشد زایشی دچار تنظیمات کاهش می شدند.

و (bisphosphate aldolase, chloroplast precursor) ۲۶۶۶ (enolase) که غالباً در مسیرهای تنفسی، محافظت پروتئینی (چپرونی)، تأمین انرژی، گلیکولیز و نسخه برداری نقش دارند با پیشرفت مراحل نمو بطور معنی داری افزایش یافت (شکل ۹) و احتمالاً این امر ناشی از بهبود شرایط محیطی و اتمام مرحله رکود (روزت) با تأمین نیاز بهاره سازی و ورود گیاه به مرحله زایشی و در نتیجه افزایش انرژی مورد نیاز برای رشد می باشد.

بیان لکه های ۷۵۲ (Putative prpol)، ۷۷۲ (70 Elongation factor)، ۸۷۱ (kDa heat shock protein RuBisCO large subunit-binding protein)، ۱۰۰۲ (2 RuBisCO)، ۱۰۰۷ (subunit beta, chloroplastic large subunit-binding protein subunit alpha)، ۱۰۶۷ (ATP synthase CF1 beta subunit)، ۱۰۶۹ (ATP synthase CF1 beta subunit)، ۱۲۳۷ (ATP synthase CF1 beta subunit ribosomal)، ۱۴۲۱ (transcription factor, putative chloroplast fructose-), ۱۴۴۳ (protein S4 Fructose-), ۱۴۵۴ (bisphosphate aldolase)

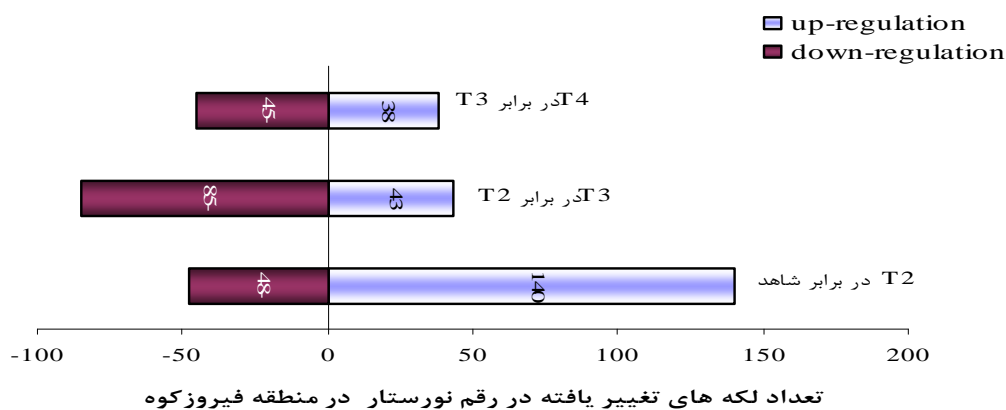


شکل ۹- الگوی بیان برخی از پروتئین ها (۷۷۲، ۷۵۲، ۸۷۱، ۱۰۰۲، ۱۰۰۷، ۱۰۶۷، ۱۰۶۹، ۱۲۳۷، ۱۴۲۱، ۱۴۴۳، ۱۴۵۴) در رقم نورستار در منطقه زنجان که تا با پیشرفت مراحل نمو افزایش یافته بودند.

نورستار در منطقه فیروزکوه

مقایسه T2 در برابر شاهد با ۱۸۸ لکه تغییر یافته بود که از بین آنها ۱۴۰ لکه دچار تنظیم افزایشی و ۴۵ لکه دچار تنظیم کاهشی شده بودند (شکل ۱۰).

در منطقه فیروزکوه مقایسات شامل T2 در برابر شاهد، T3 در برابر T2 و T4 در برابر T3 بود. نتایج اولیه نشان داد که در این منطقه بیشترین میزان تغییرات در



شکل ۱۰- تعداد لکه های تغییر یافته در طی مقایسات انجام شده در رقم نورستار در منطقه فیروزکوه

غشاء سلولی بعنوان جایگاه اولیه برای دریافت سیگنال های مرتبط با دما می باشد و با کاهش دما غشاء سخت می گردد و با بهم خوردن نظم و بازآرایی میکروتیوبولها و میکروفیلانمنت های اکتینی جریان ورودی کلسیم به درون سلول تحریک می شود و آبشار سیگنال دهی مرتبط با کلسیم بکار می افتد. در حقیقت تغییرات اکتینی بعنوان واسطه برای انتقال سیگنال بیرونی به درون سلول و ارتباط دادن آن با مسیر وابسته به کلسیم می باشد (اوروار^۱ و همکاران، ۲۰۰۰). طبیعی به نظر می رسد با رفع برطرف شدن نیاز بهاره سازی و افزایش در دمای هوا میزان اکتین در سلول کاهش یابد. پروتئین های متصل به عناصر پاسخگو در برابر دهیدراسیون^۲ خانواده بزرگی از پروتئین دخیل در تنظیم بیان ژن مرتبط با تحمل به انجماد از جمله فاکتورهای رونویسی CBF^۳ را در بر می گیرند. کاهش بیان پروتئین مذکور به کاهش یا توقف فرایند های مرتبط با تحمل به انجماد با شروع رشد زایشی اشاره دارد.

بررسی الگوی بیان پروتئین ها در رقم نورستار در منطقه فیروزکوه نشان داد که روند بیان ۳۴ لکه (شکل

بررسی لکه ها در مقایسه تاریخ نمونه برداری T3 در برابر T2 که مصادف با آغاز مرحله زایشی در این رقم بود نشان داد که لکه های ۷۴۲ (با ۱/۶۴ برابر افزایش)، ۷۵۲ (ribulose-1,5-) ۱۰۴۲ (با ۱/۶۱ برابر)، Putative prp1 bisphosphate carboxylase/oxygenase large ATP subunit (با ۱/۵۶ برابر، شکل ۱۱)، ۱۰۶۹ (synthase CF1 beta subunit (با ۱/۴۲ برابر)، ۲۱۹۱ (Oxygen-evolving enhancer protein 2) (با ۱/۳۷ برابر)، ۲۳۳۸ (cytoplasmic Aconitate hydratase) (با ۱/۳۵ برابر) و ۷۸۳ (Histone H2B.2) (با ۱/۳۴ برابر) بیشترین میزان افزایش را به خود اختصاص داده بودند. نگاه اجمالی به کارکرد پروتئین های مذکور حاکی از تقویت دستگاه فتوسنتزی، مسیره های تولید انرژی و فعالیت های متابولیکی درون سلولی در حین این دوره از نمونه برداری می باشد.

از سوی دیگر بیشترین میزان کاهش در لکه های ۱۲۹۲ (actin) (با ۵۷ درصد)، ۹۵۱ (dehydration response element binding protein) (با ۵۱ درصد)، ۱۹۴۵ (aldehyde-lyase/ threonine aldolase) (با ۴۸ درصد)، ۲۴۶۸ (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, large subunit) (تا ۴۳ درصد) و ۱۳۳۵ (Photosystem II 44 kDa reaction center protein) (P6 protein) (با ۴۱ درصد) مشاهده شد.

1. Orvar

2. Dehydration response element binding protein

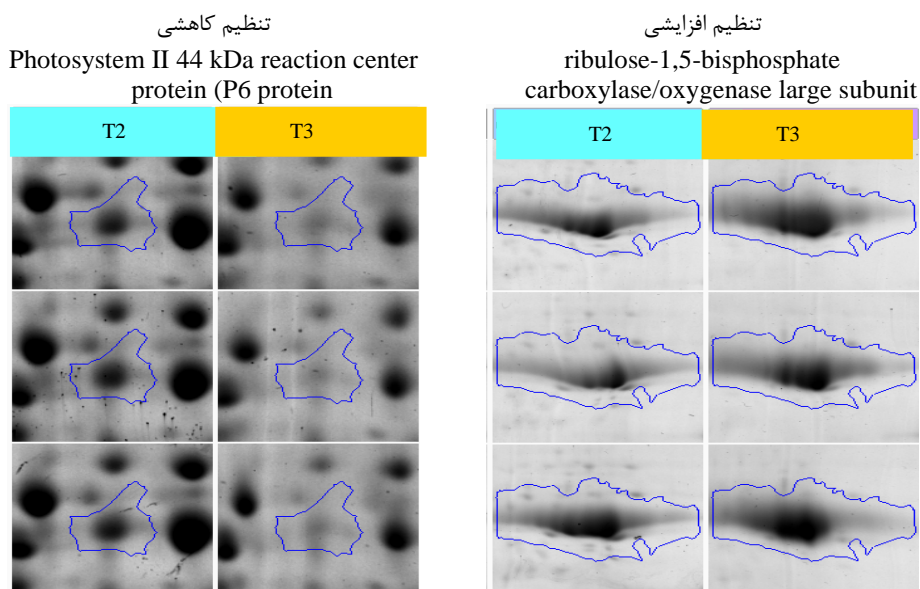
3. Repeat binding factor (an AP2-type transcription factor)

برابر T2) نشان داد که ۴ لکه شامل ۴۸۸ DNA (ligase containing RING)، ۱۰۷۲ (helicase, putative Eukaryotic translation)، ۱۸۷۰ و ۲۶۸۲ (finger initiation factor 5A) به صورت مشترک در منطقه کرج و فیروزکوه دچار تغییرات افزایشی شدند. لکه های مذکور در بازسازی و همانند سازی DNA (۴۸۸)، چرخه سلولی (۱۰۷۲) و بیوسنتز پروتئین ها (۲۶۸۶) نقش دارند.

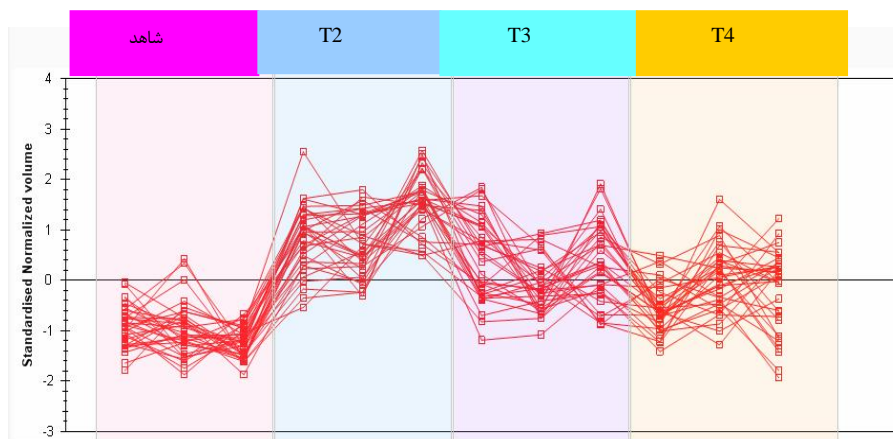
۱۲) مشابه روند تحمل به انجماد در طی تاریخ های نمونه برداری می باشد. بخش اعظمی از پروتئین های مذکور در فرایند گلیکولیز، تاخوردگی پروتئین ها، رونویسی، فرایند های متابولیکی و عکس العمل به سرما نقش داشتند (جدول ۲).

ب) بررسی تغییرات افزایشی و کاهششی مشابه رقم نورستار در بین مناطق

بررسی لکه های با تغییرات افزایشی در رقم نورستار در طی انتقال از مرحله رویشی به زایشی (مقایسه T3 در



شکل ۱۱- نمونه ای از تنظیم افزایشی و کاهششی در رقم نورستار در منطقه فیروزکوه طی انتقال از مرحله حداکثر تحمل انجماد (T2) به مرحله آغاز رشد زایشی (T3). شکل ها بیانگر سه تکرار از هر نمونه هستند.



شکل ۱۲- الگوی بیان برخی از پروتئین ها در رقم نورستار در منطقه فیروزکوه که مشابه روند تحمل به انجماد در تاریخ های نمونه برداری بود (لکه های پروتئینی در جدول ۲ آورده شده اند).

جدول ۲- نام و کارکرد پروتئین های گندم که در منطقه فیروزکوه روند بیان آنها در تاریخ های نمونه برداری مشابه با روند تحمل به انجماد بود.

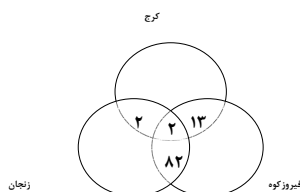
| شماره لکه | نام پروتئین | کارکرد |
|-----------|--|---|
| ۶۸۳ | Unnamed protein | نا مشخص |
| ۷۷۲ | 70 kDa heat shock protein | تاخوردگی پروتئین ها، عکس العمل به تنش |
| ۹۹۳ | Extracellular lipase | تجزیه لیپید |
| ۱۱۳۲ | Expressed protein Q7XDY9 | نامشخص |
| ۱۲۳۰ | DnaJ protein | تاخوردگی پروتئین |
| ۱۲۶۳ | Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2 | فسفریلاسیون، انتقال سیگنال |
| ۱۳۰۴ | NI | |
| ۱۳۵۹ | Fructose-bisphosphate aldolase | گلیکولیز |
| ۱۳۹۸ | ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activase | فتوسنتز، عکس العمل به سرما و نور |
| ۱۴۰۱ | ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activase | فتوسنتز، عکس العمل به سرما و نور |
| ۱۴۰۷ | Photosystem II stability/assembly factor HCF136 | فتوسنتز |
| ۱۴۱۹ | cytosolic malate dehydrogenase | گلیکولیز، سوخت و ساز ملات، اکسیداسیون و احیاء |
| ۱۴۲۲ | NI | |
| ۱۴۲۳ | Ps16 protein | نسخه برداری، عکس العمل به سرما |
| ۱۴۲۴ | NI | |
| ۱۴۲۷ | MRNA-binding protein | فرایندهای متابولیکی سلول |
| ۱۴۴۳ | chloroplast fructose-bisphosphate aldolase | گلیکولیز |
| ۱۴۴۶ | Cytochrome c | انتقال الکترون در زنجیره تنفسی |
| ۱۴۴۸ | glycerol-3-phosphate dehydrogenase | اکسیداسیون و احیاء |
| ۱۴۵۴ | fructose-bisphosphate aldolase | گلیکولیز |
| ۱۴۷۷ | Translated in frame 2 | |
| ۱۵۶۳ | mitochondrial cysteine synthase | سنتز اسید آمینه |
| ۱۵۶۷ | Cytochrome P450-like | اکسیداسیون و احیاء |
| ۱۷۰۷ | MLA27-2 | آپوپتوسیس، فرایندهای دفاعی |
| ۱۹۳۲ | protein At2g37660, chloroplast precursor | فرایند های دفاعی و متابولیکی |
| ۱۹۹۴ | NI | |
| ۲۰۶۰ | ascorbate peroxidase | اسکاوونجینگ، اکسیداسیون و احیاء |
| ۲۰۶۵ | NI | |
| ۲۰۸۸ | NI | |
| ۲۱۴۴ | Regulator of chromosome condensation/beta-lactamase-inhibitor protein II | نسخه برداری |
| ۲۱۹۰ | utative 20 kDa chaperonin, chloroplast | تاخوردگی پروتئین |
| ۲۴۳۲ | MADS-box transcription factor 26 | تنظیم نسخه برداری |
| ۲۶۵۰ | Os03g0189600 | اکسیداسیون و احیاء |
| ۲۶۶۸ | NI | |

NI: لکه شناسایی نشده

licensing factor MCM4 درگیر در همانند سازی (DNA، ۱۳۸۸، ۱۴۳۹، ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activase، درگیر در فتوسنتز، عکس العمل در برابر سرما و نور) و ۱۵۶۰ (D86208 protein، F22G5.34، درگیر در ترجمه mRNA) در بین مناطق کرج و زنجان مشترک بود. در مناطق سرد زنجان و فیروزکوه بیان ۱۰ لکه به

نتایج حاکی از آن بود که ۸ لکه شامل ۱۶۶، ۹۵۱ (dehydration response element binding protein)، درگیر در رونویسی و عکس العمل در برابر تنش)، ۹۹۴ (RuBisCO large subunit-binding protein subunit)، alpha، درگیر در تنظیم تاخوردگی پروتئین)، ۱۱۰۸ (UDP-glucose pyrophosphorylase)، درگیر در مسیره های متابولیکی)، ۱۳۳۷ (Putative replication)

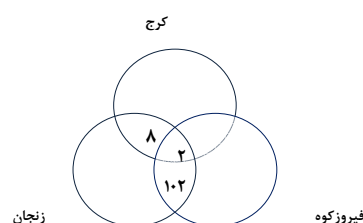
P0668H12.12، درگیر مسیرهای انتقال سیگنال)، ۱۲۲۹، ۱۲۳۰ (DnaJ protein)، درگیر در فرایند تاخوردگی پروتئین ها)، ۱۲۳۳ (Methionine adenosyltransferase)، درگیر در فرایند متابولیسمی کربن)، ۱۲۳۷ (transcription factor)، درگیر در نسخه برداری)، ۱۳۹۸ (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activase)، درگیر در فرایند فتوسنتز، عکس العمل در برابر سرما و نور)، ۱۴۴۶، ۱۸۹۵، ۱۹۳۲ (phosphoribulokinase-like protein 2)، درگیر در فرایندهای متابولیسمی)، ۱۹۳۸، ۱۹۶۰ (Adenylate cyclase)، بیوسنتز cAMP و تنظیم سیگنال دهی) و ۲۳۶۹ بودند. بررسی لکه های کاهشی این رقم در بین مناطق سرد زنجان و فیروزکوه نشان داد که ۸ لکه به صورت مشترک تغییرات کاهشی نشان می دهند. این لکه ها شامل ۴۱۹ (temperature-induced lipocalin-)، درگیر در نقل و انتقالات)، ۴۶۵ (glycine



decarboxylase P subunit، درگیر در اکسیداسیون و احیاء و دکربوکسیلاسیون گلايسين)، ۱۰۴۳، ۱۰۴۹، ۱۲۴۴ (Translational elongation factor Tu)، درگیر در بیوسنتز پروتئین ها)، ۱۲۹۲ (actin)، درگیر در حرکات سلولی از طریق میکروفیلانمنت ها، عکس العمل در برابر سرما)، ۱۳۳۵ (Photosystem II 44 kDa reaction center protein)، درگیر در فتوسنتز) و ۱۴۱۶ بودند. نتایج نشان داد که ۲ لکه ۲۵۲۱ و ۲۶۷۶ بصورت مشترک در هر سه منطقه دچار تغییرات کاهشی شده بودند (شکل ۱۴).

شکل ۱۴- تعداد لکه های مشترک که در رقم زمستانه نورستار کشت شده در ۳ منطقه در طی انتقال از مرحله اوج تحمل به انجماد به مرحله زایشی (برجستگی دوگانه) دچار تنظیم کاهشی شده بودند.

طور مشترک افزایش یافته بود. این لکه ها شامل ۷۴۲، ۷۵۲ (Putative prpol)، درگیر در همانند سازی DNA)، ۸۷۱ (Elongation factor 2)، درگیر در بیوسنتز پروتئین)، ۸۷۹، ۹۳۶ (Aldehyde dehydrogenase like protein)، درگیر در اکسیداسیون و احیاء)، ۲۱۵۴ (Ribulose-phosphate 3-epimerase)، درگیر در مسیر پنتوز فسفات)، ۲۱۹۲، ۲۲۴۱، ۲۳۳۸ (Aconitate hydratase cytoplasmic)، درگیر در فرایند متابولیسمی) و ۲۶۵۳ (dehydrogenase)، درگیر بیوسنتز متیونین، ترونئین و اکسیداسیون و احیاء) بودند. بررسی ها نشان که ۲ لکه ۱۰۶۹ (ATP synthase CF1 beta subunit)، درگیر در سنتز ATP، انتقال یونهای هیدروژن و سایر یونها) و ۲۶۶۶ (enolase)، درگیر در گلیکولیز) به صورت مشترک در هر سه منطقه در طی مرحله زایشی در مقایسه با مراحل قبلی دچار تنظیم افزایشی شده بودند (شکل ۱۳).



شکل ۱۳- تعداد لکه های مشترک که در رقم زمستانه نورستار کشت شده در ۳ منطقه در طی انتقال از مرحله اوج تحمل (T2) به انجماد به مرحله زایشی (برجستگی دوگانه) (T3) دچار تنظیم افزایشی شده بودند.

بررسی لکه های دارای تغییرات کاهشی در رقم نورستار در طی انتقال از مرحله رویشی به زایشی در سه منطقه نشان داد که ۲ لکه شامل ۹۵۴ (phosphoglycerate mutase)، درگیر در فرایند سوخت و ساز گلوکز) و ۲۴۱۰ (Serpine)، درگیر در بازسازی پروتئینها) به صورت مشترک در مناطق کرج و زنجان با تغییرات کاهشی مواجه شده بودند. بررسی لکه ها در این رقم نشان داد که در مناطق کرج و فیروزکوه ۱۳ لکه در طی مقایسه T3 در برابر T2 دچار تغییرات کاهشی شده بودند که شامل ۸۰۱، ۹۴۸ (protein

نتیجه گیری

بطور کلی نتایج بدست آمده حاکی از آن است که بیشترین پروتئین های تغییر یافته در طی مراحل مورد بررسی که تماما با تغییر در تحمل انجماد گیاهان همراه بود شامل پروتئین های ساختاری و آنزیم های فتوسنتزی نظیر زیرواحدهای آلفا و بتا آنزیم روبیسکو، چپرون های درگیر در تاخوردگی سایر پروتئین ها، آپوپتوسیس، آنزیم های مرتبط با پاکسازی گونه های فعال اکسیژن نظیر پراکسیداز، اسکوربات ردواکتاز و سوپر اکسید دیسموتاز، پروتئین های درگیر در نسخه برداری نظیر فاکتورهای رونویسی خانواده AP2 و dehydration response element binding protein پروتئین های درگیر در زنجیره انتقال الکترون تنفسی نظیر NADH دهیدروژناز، برخی از آنزیمهای چندکاره^۱ فتوسنتزی نظیر روبیسکو اکتیواز (دارای نقش فتوسنتزی، چپرونی و همچنین عکس العمل به سرما) و پروتئین های ۲۲ و ۴۴ کیلودالتونی فتوسنتزی، پروتئین های درگیر در سنتز ATP و حفظ وضعیت ریدوکسی درون سلولی، بیوسنتز اسید های آمینه (به خصوص سیستئین، ترونتین، آسپارژین و متیونین) پروتئین، انتقال یونها، بازدارنده های پروتئیناز نظیر serpin و سازماندهی حرکات سلولی و میکروفیلانمنت ها (اکتین ها) بودند.

بررسی روند بیان پروتئین ها در مناطق حاکی از آن بود که پروتئین هایی نظیر پروتئین فتوسنتزی Photosystem II stability/assembly factor HCF136، پروتئین های ساختاری و کارکردی درگیر در تجزیه آب طی واکنش نوری (oxygen evolving protein 1)

1. Multifunction

2 and)، آنزیم روبیسکو اکتیواز، زیر واحدهای الفا و بتا آنزیم روبیسکو، آنزیم گلیکولیزی فروکتوز بیس فسفات آلدولاز، پروتئین Ps16 (که در آزمایشات سایر محققین نیز افزایش بیان آن طی عادت دهی به سرما مشاهده شده بود و متصل به نوکلئوتید اسید ها بوده و به نظر می رسد در تنظیم نسخه برداری نقش داشته باشد. پروتئین cp31BHV (پروتئین متصل به نوکلئوتید اسیدها)، Regulator of chromosome condensations/beta-lactamase-inhibitor protein که در متراکم شدن کروموزم بعد از تقسیمات سلولی نقش دارد، زیر واحدهای پروتئین ATP سینتاز (ایزوفرم کلروپلاستی آن)، چپرون های Hsp70، آنزیم سیستئین سینتاز و پروتئین serpin در بین مناطق در طی دوره های نمونه برداری از روند مشابه با روند تحمل به انجماد تبعیت می کنند..

علاوه برآن بررسی محل جاگیری پروتئین ها در درون سلول نشان داد که ۲۲ درصد از کل پروتئین های شناسایی شده در اندامک کلروپلاست جای دارند. اهمیت و ارزش پروتئین های اندامک کلروپلاست در تعیین تحمل به انجماد و یا حساسیت بالای آنها در برابر تغییرات دمایی پیش تر نیز توسط Kosmalal et al (2009) و Yan et al (2006) مورد تأکید قرار گرفته بود و نتایج این بررسی نیز آن را مورد تأیید قرار داد.

سپاسگزاری

این تحقیق حاصل همکاری مشترک دانشگاه تهران، موسسه تهیه و اصلاح نهال و بذر کرج و موسسه تحقیقاتی IPK آلمان می باشد که بدینوسیله تشکر و قدردانی می شود.

REFERENCES

1. Amme, S., Rutten, T., Melzer, M., Sonsmann, G., Vissers, J.P.C., Schlesier, B., & Mock, H.P. (2005). A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes. *Proteomics*, 5, 2508-2518.
2. Amme, S., Matros, A., Schlesier, B., & Mock, H.P. (2006). Proteome analysis of cold stress response in *Arabidopsis thaliana* using DIGE-technology. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1537-1546.
3. Belkhadir, Y., Subramaniam, R., & Dangl, J.L. (2004). Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion Plant Biology*, 7:391-399.
4. Bertini, L., Proietti, S., Caporale, C., & Caruso, C. (2009). Molecular characterization of a wheat protein induced by vernalisation. *Protein Journal*, 28, 253-262
5. Fowler, D. B., Limin, A. E., Wang, S. Y., & Ward, R. W. (1996). Relationship between low-temperature tolerance and vernalization response in wheat and rye. *Canadian Journal of Plant Sciences*, 76, 37-42.
6. Fowler, D.B., Breton, G., Limin, A. E., Mahfoozi S., & Sarhan, F. (2001). Photoperiod and temperature interactions regulate low-temperature-induced gene expression in barley. *Plant Physiology*, 127: 1676-1681.

7. Fowler, S., & Thomashow, M.F. (2002). *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell*, 14, 1675–1690.
8. Fowler, D.B. & Limin, A. E. (2004). Interactions among factors regulating phenological development and acclimation rate determine low-temperature tolerance in wheat. *Annals of Botany*, 94, 717-724.
9. Gusta, L.V., Trischuk, R., & Weiser, C.J. (2005). Plant Cold Acclimation: The Role of Abscisic Acid. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24,308–318.
10. Herman, E.M., Rotter, K., Premakumar, R., Elwinger, G., Bae, R., Ehler-King, L., Chen, S., & Livingston. D. P. (2006). Additional freeze hardiness in wheat acquired by exposure to -3 °C is associated with extensive physiological, morphological, and molecular changes. *Journal of Experimental Botany*, 57, 3601–3618.
11. Ideker, T., Thorsson, J V., Ranish, A., Christmas, R., Buhler, J., Eng, J.K., Bumgarner, R., Goodlett, D.R., Aebersold, R., & Hood. L. (2001). Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science*, 292, 929–934.
12. Janmohammadi, M., Tavakkol-Afshari, R., Mahfoozi, S., Alizadeh, H., Kamel, M., and Khiavi, M. (2010). Relationship among phenological, development, physiological indices and freezing tolerance in winter wheat and rye under field conditions in moderate and cold regions. *Electronic Journal of Crop Production*, 3, 115-137.
13. Kang, D.I, Song Gho, Y., Suh, M., & Kang, C. (2002). Highly sensitive and protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull. Korean Chemistry Society*, 23, 1511-1512.
14. Khajehpour, M.R. (2006). Climate classification. Key article. *The 9th Iranian Crop Sciences Congress*. Aug 27-29, Aboureyhan Campus- University of Tehran.
15. Kosmala, A., Bocian, A., Rapacz, M., Jurczyk, B., & Zwierzykowski, Z. (2009). Identification of leaf proteins differentially accumulated during cold acclimation between *Festuca pratensis* plants with distinct levels of frost tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 60: 3595–3609.
16. Komatsu, S., Yamada, E., & Furukawa, K. (2009). Cold stress changes the concanavalin, A-positive glycosylation pattern of proteins expressed in the basal parts of rice leaf sheaths. *Amino Acids*, 36,115–123
17. Limin A. E. & Fowler, D. B. (2006). Low-temperature tolerance and genetic potential in wheat (*Triticum aestivum* L.): responses to photoperiod, vernalization and plant development. *Planta*, 224, 360-366.
18. Mahfoozi, S., Limin, A.E., & Fowler, D.B. (2001). Influence of vernalization and photoperiod response on cold hardiness in winter cereals. *Crop Science*, 41, 1006-1011.
19. Mahfoozi, S., Limin, A.E., Ahakpaz, F., & Fowler, D.B. (2006). Phenological development and expression of freezing resistance in spring and winter wheat under field conditions in north-west Iran. *Field Crop Research*, 97, 182-187.
20. Sasani, S., Hemming, M.N., Oliver S.N., Greenup, A., Tavakkol Afshari, R., Mahfoozi, S., Poustini K., Sharifi H.R., Dennis E.H., James W., Trevaskis, B. (2009). The influence of vernalization and daylength on expression of flowering-time genes in the shoot apex and leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *Journal of Experimental Botany*, 60, 2169-2178 .
21. Vítámvás, P., Saalbach, G., Prášil, I.T., Apková, V., Opatrná, J., Jahoor. A., 2007. WCS120 protein family and proteins soluble upon boiling in cold-acclimated winter wheat. *Journal of Plant Physiology*, 164, 1197-1207.
22. Yan, S.P., Zhang, Q.Y., Tang, Z.C., Su, W.A., & Sun, W.N. (2006). Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Molecular Cell Proteomics*, 5,484–496.