

آنالیز شبکه هم‌بیان ژنی وزن‌دار برای یافتن ماژول‌های تنظیم‌شونده توسط هورمون جاسمونیک اسید در آرابیدوپسیس

مریم مرتضایی فرا^۱، رضا فتوت^{۲*}، فرید شکاری^۳، شهریار ساسانی^۴

۱، ۲، ۳. دانشجوی دکتری، استادیار و دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان

۴. استادیار بخش زراعت، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، کرمانشاه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۳/۲۴)

Weighted gene co-expression network analysis of regulatory modules by jasmonic acid in Arabidopsis

Maryam Mortezaeefar¹, Reza Fotovat^{2*}, Farid Shekari³, Shahryar Sasani⁴

1, 2, 3. Ph.D. Candidate Student, Assistant Professor and Associate Professor of Biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

4. Assistant Professor, Agricultural and Natural Resources Research Centre of Kermanshah, Kermanshah, Iran

(Received: Jan. 8, 2017 - Accepted: Jun. 14, 2017)

Abstract

Environmental conditions lead to biosynthesis of signaling molecules including phytohormones in plants which have important functions as primary messengers in signal transduction and regulating cell metabolism. Jasmonic acid hormone by controlling the transcription factors can play key roles in response to various stresses and developmental processes in plants. Despite numerous studies, plant responses to the hormone are not completely understood. Here, microarray data of Arabidopsis from GEO database was used for analysis of co-expression network. WGCNA (Weighted Gene Co-expression Network Analysis) analysis determines 25 gene groups (modules) that their expression profiles correlated highly significant with each other in response to jasmonic acid. Gene ontology was utilized to investigate each module for statistical significance. This analysis indicated that jasmonic acid controls many processes including photosynthesis, cell programmed death, and response to various stresses. In addition, many of transcription factors such as 11 genes of NAC family and 12 genes of bHLH family play roles in the regulation of jasmonic acid responses and adjust processes including response to biotic and abiotic stresses, flower development and response to light.

Keywords: biotic and abiotic stress, flowering, photosynthesis, programming cell death, system biology.

چکیده

شرایط محیطی منجر به ساخت ملکول‌های پیام‌رسان از جمله فیتوهورمون‌ها در گیاهان می‌گردد که وظایف مهمی بعنوان پیام‌رسان اولیه در مسیر ترانس‌اسی و تنظیم فعالیت‌های سوخت و ساز سلول را به عهده دارند. هورمون جاسمونیک اسید با کنترل عامل‌های رونویسی در فرآیندهای نموی و پاسخ گیاهان به تنش‌های مختلف نقشی کلیدی ایفا می‌کند. با وجود مطالعات فراوان صورت گرفته، پاسخ گیاهان به این هورمون به طور کامل شناخته نشده است. در اینجا، داده‌های ریزآرایه مربوط به گیاه آرابیدوپسیس از پایگاه داده GEO برای آنالیز شبکه هم‌بیانی مورد استفاده قرار گرفت. از تجزیه تحلیل آن‌ها با روش WGCNA (شبکه هم‌بیانی ژنی وزن‌دار)، ۲۵ گروه ژنی (ماژول) بدست آمد که پروفایل بیانی آنها در پاسخ به جاسمونیک اسید با یکدیگر دارای همبستگی معنی‌دار بالایی بود. برای بررسی معنی‌دار بودن آماری هر ماژول از نظر زیستی از تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن استفاده شد. نتایج نشان داد که فرآیندهای زیادی از جمله فتوسنتز، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و پاسخ به تنش‌های مختلف به وسیله جاسمونات کنترل شدند. علاوه بر این، تعداد زیادی عامل رونویسی، برای مثال ۱۱ ژن از خانواده NAC و ۱۲ ژن از خانواده bHLH، در تنظیم پاسخ‌های جاسمونیک اسید نقش داشتند و فرآیندهایی همچون پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی، نمو گل و پاسخ به نور را کنترل نمودند.

واژه‌های کلیدی: تنش‌های زیستی و غیرزیستی، گلدهی، فتوسنتز، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، زیست‌شناسی سامانه‌ها.

مقدمه

هورمون جاسمونیک‌اسید (JA) در سیستم دفاعی و نمو گیاهان نقش کلیدی دارد. این هورمون ملکول مشتق شده از لیپیدها می‌باشد که فرآیندهای متنوعی همچون پاسخ‌های سازگاری به تنش‌های زیستی و غیرزیستی (Lyons *et al.*, 2013) و همچنین فرآیندهای نمو گل، جنین‌زایی، جوانه‌زنی بذر، رسیدگی میوه و پیری برگ را در گیاهان تنظیم می‌کند (Balbi & Devoto, 2008). علاوه بر این، JA در مواجهه با نور فرابنفش، بیماری‌های قارچی، و دماهای بالا نیز تجمع می‌یابد (Reinbothe *et al.*, 2009).

در گیاه JA، پروتئین‌های Jasmonate ZIM domain (JAZ) رونویسی از ترکیبات مسیر ترانس‌سانی JA، همچون عامل رونویسی MYC2 و همولوگ‌های آن MYC3 و MYC4، را ممانعت می‌کند. پروتئین JA-Ile (که به سرعت در پاسخ به القاگرهای زیستی و غیرزیستی تولید می‌شود) به coronatine insensitive 1 (COI1) متصل می‌شود و پروتئین‌های JAZ را برای تجزیه توسط پروتئوزوم‌ها هدف‌گذاری می‌کنند. در نتیجه این عمل حالت سرکوب عامل‌های رونویسی MYC از بین می‌رود (Sheard *et al.*, 2010) و عامل‌های رونویسی MYC قادر خواهند بود تا به توالی‌های G-box و شبه G-box موجود در راه‌انداز ژن‌های پاسخ‌دهنده به JA متصل شوند (Fernández-Calvo *et al.*, 2011) و از این طریق رونویسی این ژن‌ها کنترل می‌شود. عامل‌های رونویسی دیگری نیز در مسیر ترانس‌سانی JA یافت شده است. عامل رونویسی ORA47 (دارای دمین AP2/ERF) به عنوان تنظیم‌کننده کلیدی در مسیر بیوستنتر و ترانس‌سانی JA و ABA تحت شرایط استرس معرفی شده است که تعداد زیادی ژن را در این مسیر کنترل می‌کند (Chen *et al.*, 2016). عامل رونویسی نوع

JAM1, bHLH، به‌عنوان تنظیم‌کننده منفی مسیر ترانس‌سانی JA از طریق سرکوب MYC2 در گیاه آراییدوپسیس عمل می‌کند و از این طریق رشد گیاه و پاسخ به استرس وابسته به JA را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Nakata *et al.*, 2013). عامل رونویسی WRKY57 نیز به‌عنوان نقطه اتصالی مسیر ترانس‌سانی اکسین و JA در کنترل پیری برگ القا شده توسط JA شناخته شده است (Jiang *et al.*, 2014). با وجود مطالعات فراوان صورت گرفته در این زمینه، هیچ مطالعه‌ای در سطح سیستم وجود ندارد.

با وجود پیشرفت‌های شگرف در تعیین توالی ژنوم گیاهان، در مورد نحوه عمل ژن‌ها اطلاعات اندکی وجود دارد (Schaefer *et al.*, 2016). بعنوان مثال در ذرت تنها عمل یک درصد ژن‌ها مشخص شده است (Andorf *et al.*, 2015). امروزه ابداع روش‌های جدید با کارایی بالا امکان بررسی بیان هزاران ژن را به‌طور همزمان فراهم کرده است. با تجزیه و تحلیل چنین داده‌هایی می‌توان به حجم بیشتری از اطلاعات درباره سیستم‌های زیستی دست یافت (Schaefer *et al.*, 2016). یکی از راهکارهای مرسوم در زیست‌شناسی سامانه‌ها بررسی ارتباطات بین ژن‌ها می‌باشد، از جمله این روش‌ها به شبکه‌های هم‌بیان ژنی می‌توان اشاره کرد که با استفاده از محاسبه همبستگی پیرسون ساخته می‌شوند (Serin *et al.*, 2016). در این شبکه‌ها ژن‌ها در صورتی با هم در ارتباط هستند که پروفایل بیانی آنها در پاسخ به شرایط بیرونی و درونی سلول به صورت همزمان تغییر کند (Zhang & Horvath, 2005). در گیاهان نیز از روش شبکه‌های هم‌بیان ژنی در بررسی ارتباطات بین ژن‌ها در موضوعات مختلف استفاده شده است (Omranian *et al.*, 2015; Takehisa *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016; Tantong *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). در شبکه‌های هم‌بیان از یک حد آستانه برای تعیین وجود یا عدم

وجود ارتباط بین دو ژن استفاده می‌شود که منجر به حذف اطلاعات بسیار زیادی می‌شود. در حالی که در شبکه‌های هم‌بیان وزن‌دار (WGCNA)^۱ از حدود بحرانی استفاده می‌شود و نتایج قویتری را نسبت به شبکه‌های غیر وزن‌دار ایجاد می‌کند (Zhang & Horvath, 2005). در این روش، پس از ایجاد شبکه، ژن‌ها را درون گروه‌های مجزا (ماژول) قرار می‌دهد. ماژول‌ها تحت عنوان خوشه‌ای از ژن‌ها تعریف می‌شوند که پروفایل بیانی آنها به شدت با یکدیگر همبستگی دارند (Bergmann *et al.*, 2004). در روش شبکه‌های هم‌بیان وزن‌دار، هر ماژول هم‌بیان می‌تواند بازتاب‌دهنده یک پیام زیستی حقیقی باشد. برای بررسی معنی‌دار یک ماژول از نظر زیستی از تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن (GO) می‌توان استفاده کرد (Langfelder & Horvath, 2008). شبکه‌های هم‌بیان وزن‌دار در بررسی ارتباط بین ژن‌های درگیر در تنش شوری در آراییدوپسیس (Kobayashi *et al.*, 2016)، پیری برگ‌ها در آفتابگردان (Moschen *et al.*, 2016)، خشکی در انگور (Hopper *et al.*, 2016) بکار رفته است. با این حال تجزیه و تحلیل شبکه ژن‌های متأثر از هورمون‌های گیاهی مثل جاسمونیک اسید کمتر مورد توجه قرار گرفته است. در این تحقیق، روش شبکه هم‌بیانی وزن‌دار مورد استفاده قرار گرفت تا گروه‌های ژنی که در مسیر ترانس‌اسی هورمون JA نقش دارند، مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

داده‌های خام ریزآرایه (با فرمت CEL) از پایگاه داده GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) به دست آمد (جدول ۱). داده‌های بیانی خام توسط الگوریتم RMA و با استفاده از نرم‌افزار

Affymetrix expression console نرمال شدند. برای انجام آنالیز شبکه از نرم‌افزار R و بسته نرم‌افزاری WGCNA استفاده شد (Zhang & Horvath, 2005; Langfelder & Horvath, 2008). ابتدا ماتریس همبستگی پیرسون از داده‌های بیانی به دست آمد. به توان ۸ رسیده تا ماتریس مجاورتی (topological overlap matrix (TOM)) به دست آید، سپس به ماتریس فاصله تبدیل و در نهایت این ماتریس به روش تجزیه خوشه‌ای سلسله‌مراتبی مورد تحلیل قرار گرفته، در نهایت ژن‌ها بر اساس روش dynamic tree cut در ماژول‌ها گروه‌بندی شدند. هر ماژول خوشه‌ای از ژن‌ها می‌باشد که پروفایل بیانی آنها همبستگی معنی‌دار بالایی با یکدیگر دارند (Zhang & Horvath, 2005).

ژن‌های هر ماژول آنالیز GO توسط نرم‌افزار آنالیز agriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO>) انجام شد و از روش Fisher's exact test برای تعیین معنی‌داری آماری و از روش Yekutieli برای کنترل FDR با $p\text{-value} < 0.001$ استفاده شد (Du *et al.*, 2010). علاوه بر این، مجموعه‌های ژنی KEGG، خانواده‌های ژنی و اهداف microRNA و عامل‌های رونویسی با استفاده از ابزار GSEA Plant^۲ (<http://structuralbiology.cau.edu.cn/PlantGSEA/>) (Yi *et al.*, 2013) به دست آمد. Fisher's exact test از استفاده از روش انجام شد. برای یافتن نرخ خطای نوع دوم از روش Yekutieli با سطح معنی‌داری پنج درصد استفاده شد. از سایت string (<http://string-db.org>) برای شناسایی و ترسیم شبکه ژن‌های مدنظر استفاده شد (Szkarczyk *et al.*, 2014). برای تبدیل ID ژن‌ها از سایت DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) استفاده شد. تجزیه و تحلیل راه‌انداز^۴

3. Gene Set Enrichment Analysis

4. Promoter

1. Weighted Gene Co-expression Network Analysis

2. Gene Ontology

ژن‌های موردنظر انتخاب شد و مکان‌های اتصالی فاکتورهای رونویسی مشترک، در میان این ژن‌ها با روش Gene Group analysis در سطح اطمینان $\leq 90\%$ تعیین شدند (Chen *et al.*, 2012).

ژن‌ها نیز با استفاده از سایت AtPAN (<http://atpan.itps.ncku.edu.tw/index.php?id=> gene_group) برای گروه‌های ژنی مد نظر انجام شد تا عناصر مشترک پاسخ دهنده به عامل‌های رونویسی تعیین شود. ۱۰۰۰ جفت باز از نواحی تنظیمی بالادست

جدول ۱. داده‌های ریزآرایه استفاده شده برای آنالیز شبکه هم‌بیانی ژن‌های پاسخ‌دهنده به JA از گیاه آرآبیدوپسیس

Accession	Sample Number	Reference	Cultivars of <i>Arabidopsis</i>	Treatment	Growth phase
GSE10732	18	(Mueller <i>et al.</i> , 2008)	tga2-5-6 mutant; ecotype Columbia	Oxylipin; phytoprostane	10- day-old seedlings
GSE17464	99	--	Laer; penta; gai	MeJA; GA; MeJA+GA; flg22;	5-weeks-old seedlings
GSE18667	12	(Lozano-Durán <i>et al.</i> , 2012)	C2 lines; PR1-LUC	MeJA	7- day-old seedlings
GSE21762	12	--	Col; coi1; ein3 eil1	JA	Seedlings
GSE35700	12	(Cerrudo <i>et al.</i> , 2012)	Col	Low and high R/FR; JA	Four-week-old rosettes
GSE4733	27	(Mandaokar <i>et al.</i> , 2006)	opr3 mutant	JA; OPDA	Stamen
GSE45662	10	(Po Hu <i>et al.</i> , 2013)	Col; Ri17	MeJA	21-day-old seedlings

معنی‌دار برای آنالیز GO بودند (به دلیل حجم بالای نتایج در اینجا آورده نشده است) که بیان‌گر این مسأله است که هورمون JA بیان بسیاری از ژن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد، اما در آنالیز GSEA تنها ۱۷ ماژول دارای عبارت‌های معنی‌دار بودند (جدول‌های ۲ و ۳).

عامل‌های رونویسی

آنالیز GO برای ماژول سیاه (black) نشان داد که ۷۵ ژن در این گروه تنظیم‌کننده رونویسی (GO:0045449) هستند (شکل ۲) که متعلق به ۱۲ خانواده ژنی مجزا بودند. دو خانواده NAC domain با ۱۱ ژن (شامل ژن‌های: *AT3G10500*, *AT3G15500*, *AT1G71930*, *AT3G10490*, *AT1G65910*, *AT5G62380*, *AT1G01720* و *AT3G17730*, *AT3G10480*, *AT4G10350* و *AT1G01010*) و bHLH با ۱۲ ژن (شامل ژن‌های *AT4G01460*, *AT3G61950*, *AT3G62090*, *AT4G09820*, *AT5G15160*, *AT1G18400*

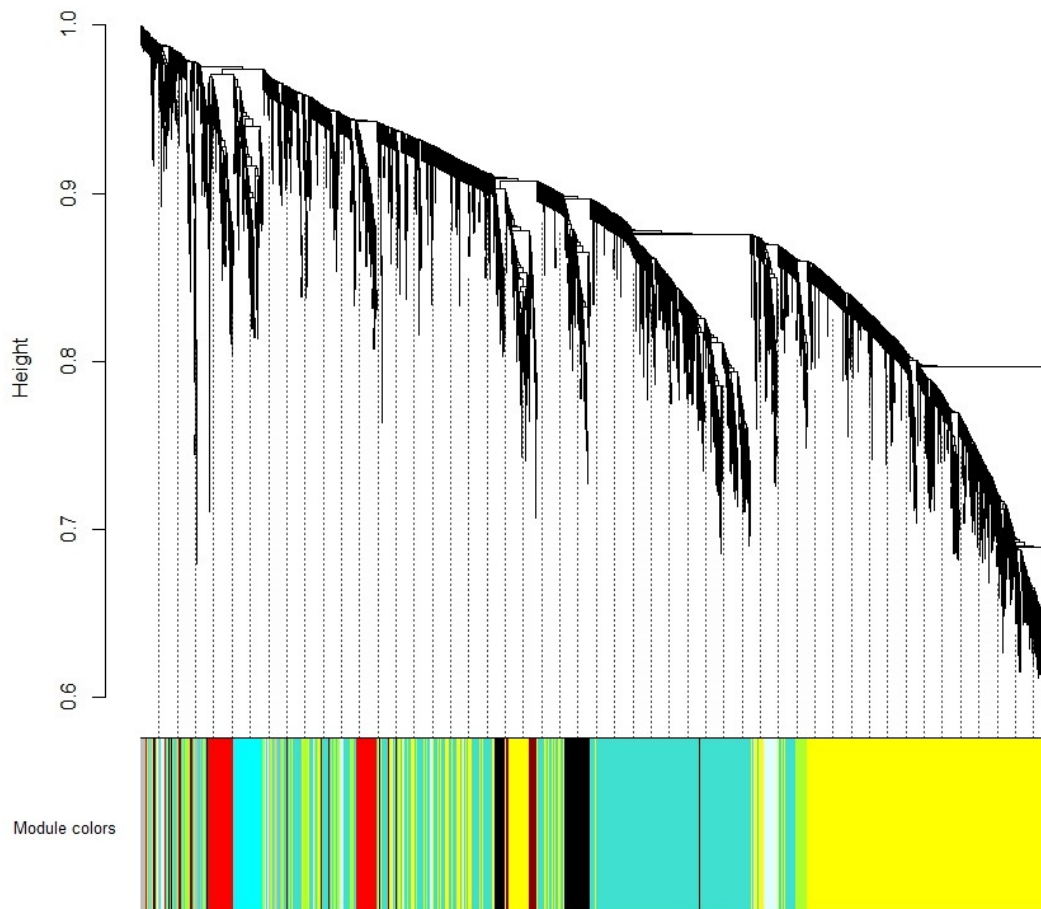
نتایج و بحث

داده‌های ریزآرایه برای این آنالیز از آزمایشات مختلف فراهم شد. ژنوتیپ‌های گیاهی مورد استفاده شامل ارقام وحشی و موتانت در مسیر ترانسسانی جاسمونیک‌اسید بودند. تیمارها نیز شامل موادی می‌باشند که یا شبه JA هستند یا اینکه مسیری مشابه با مسیر ترانسسانی JA را تحت تأثیر قرار می‌دهند (جدول ۱). در ابتدا داده‌های ریزآرایه نرمال شد. در مرحله بعد، شبکه هم‌بیانی ایجاد شد که ژن‌ها را درون ۲۵ گروه ژنی یا ماژول قرار داد و با استفاده از امکانات نرم‌افزار R هر ماژول با رنگ خاصی نشان‌مند شد (شکل ۱). ماژول‌های فیروزه‌ای (turquoise)، آبی (blue) و قهوه‌ای (brown) دارای بیشترین تعداد ژن با ۵۴۹۹، ۳۵۰۵ و ۳۳۱۴ ژن و ماژول‌های سبز آووکادو (darkgreen)، فیروزه‌ای سیر (darkturquoise) و خاکستری سیر (darkgrey) دارای کمترین تعداد ژن با ۶۱، ۴۹ و ۳۲ ژن بودند. از آنجا که همه ژن‌های آرآبیدوپسیس برای آنالیز شبکه استفاده شد، معنی‌داری آماری این ماژول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. همه ماژول‌ها دارای عبارت‌های

(Fankhauser, 2005). شواهد نشان داده است که اعضای خانواده bHLH در فرآیندهای زیستی خاص شرکت دارند. برای مثال می‌توان *TabHLH1* در تحمل گیاه گندم به کمبود نیتروژن و فسفات (Yang *et al.*, 2016)، *PIF1* در تنظیم ساخت کلروفیل II در گیاه آرابیدوپسیس (Moon *et al.*, 2008) و *MdCibHLH1* و *OsbHLH148* در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی (Seo *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2012) اشاره نمود.

AT5G39860، *AT5G54680*، *AT4G02590*، *AT1G73830* و *AT1G68810*، *AT4G14410* بیشترین تعداد ژن‌ها را دارند. مطالعات نشان داده‌اند که بسیاری از اعضای خانواده bHLH در ترانس‌اسیون‌های نوری نقش دارند و نقش‌های کلیدی را در انتقال پیام فیتوکروم‌ها ایفا می‌کنند به گونه‌ای که آنها را با عنوان PIF (phytochrome interacting factor) یا PIL (phytochrome interacting factor-like) نامگذاری می‌کنند (Duek &

Cluster Dendrogram



شکل ۱. شبکه هم‌بیانی وزن‌دار برای پاسخ گیاه آرابیدوپسیس به هورمون JA، دندروگرام بر اساس روش خوشه‌بندی سلسله مراتبی از ماتریس فاصله TO ایجاد شد. گروه‌بندی ژن‌ها بر اساس روش dynamic tree cut است. در اینجا، ۲۵ ماژول حاوی ژن‌های هم‌بیان تعیین شد که هر ماژول با رنگی خاص نشانمند شده که در زیر شکل نشان داده شده است.

جدول ۲. نتایج GSEA برای ماژول‌های به دست آمده از شبکه هم‌بیانی JA با $FDR \leq 0.05$

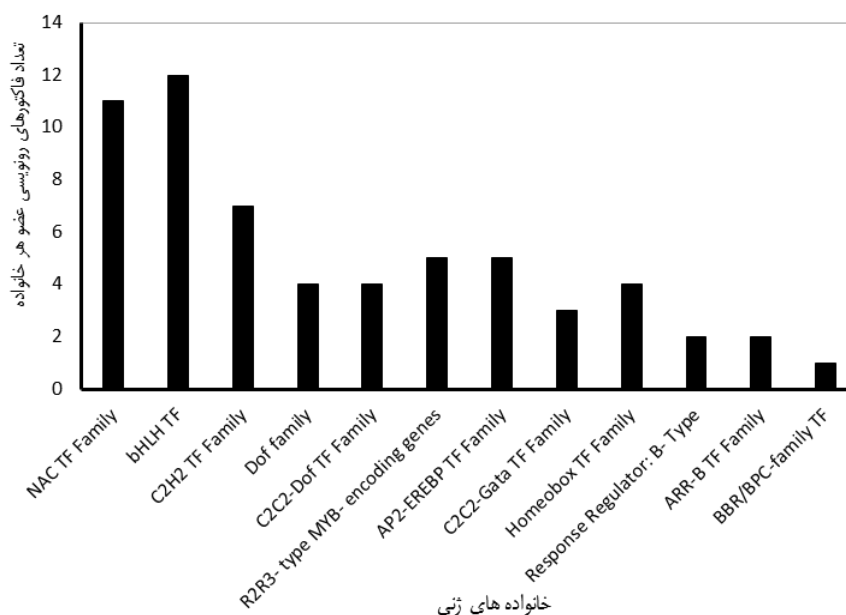
Description of gene set (No of probsetIDs in each module)	Category	p-value	Description of gene set (No of probsetIDs in each module)	Category	p-value
Module: blue (3630 probsetIDs)			Module: yellow (2185 probsetIDs)		
Plant-pathogen interaction (41)	KEGG	6.04e-06	Ribosome (170)	KEGG	3.02e-88
target genes of TF: SEPALLATA3 (11)	TFT	5.31e-05	Core Cell Cycle Genes (19)	Gfam	2.21e-06
target genes of TF: AP2 (39)	TFT	5.97e-4	Oxidative phosphorylation (28)	KEGG	2.88e-05
Module: cyan (292 probsetIDs)			Module: turquoise (5688 probsetIDs)		
E2 - Ubiquitin Conjugating Enzyme (7)	Gfam	1.14e-06	Receptor kinase-like protein family (122)	Gfam	3.42e-10
Ubiquitin mediated proteolysis (8)	KEGG	3.21e-3	target genes of TF: HY5 (85)	TFT	6.98e-3
CCAAT-HAP5 TF Family (4)	Gfam	3.56e-3	Metabolic pathways (305)	KEGG	2.59e-4
Module: darkgreen (61 probsetIDs)			Biosynthesis of plant hormones (92)	KEGG	3.51e-4
Proteasome (28)	KEGG	8.11e-56	Module: tan (295 probsetIDs)		
Module: darkred (120 probsetIDs)			target genes of TF: AtbHLH15 (21)	TFT	6.04e-05
target genes of TF: E2Fa/Dpa (21)	TFT	5.51e-28	TUB TF Family (3)	Gfam	2.91e-4
DNA replication (14)	KEGG	3.21e-22	Glycosyltransferase Gene Families ,Glycosyltransferase- Family 20 (3)	Gfam	2.91e-4
Nucleotide excision repair (6)	KEGG	1.38e-07	Module: salmon (288 probsetIDs)		
Mismatch repair (5)	KEGG	2.09e-07	Glycolysis / Gluconeogenesis (8)	KEGG	6.08e-06
Core Cell Cycle Genes (4)	Gfam	1.57e-4	Biosynthesis of terpenoids and steroids (9)	KEGG	2.57e-4
Putative targets of mir837 (2)	MIR	4.71e-4	Module: royalblue (118 probsetIDs)		
Module: darkturquoise (49 probsetIDs)			Receptor kinase-like protein family (17)	Gfam	1.04e-13
Receptor kinase-like protein family (7)	Gfam	8.55e-07	Cytochrome P450 ,CYP76C (2)	Gfam	6.97e-4
AP2-EREBP TF Family (5)	Gfam	4.04e-06	Module: midnightblue (207 probsetIDs)		
target genes of TF: HY5 (6)	TFT	2.08e-06	Organic Solute Cotransporters ,Adenylate translocator (brittle-1)-like family (3)	Gfam	1.3e-4
Module: green (1464 probsetIDs)			target genes of TF: E2Fa/Dpa (5)	TFT	1.34e-3
Class III peroxidase (28)	Gfam	2.13e-13	Module: magenta (457 probsetIDs)		
Methane metabolism (26)	KEGG	5.03e-11	Putative targets of mir414 (11)	MIR	9.91e-05
Phenylalanine metabolism (25)	KEGG	1.52e-10	Spliceosome (12)	KEGG	4.96e-07
Phenylpropanoid biosynthesis (27)	KEGG	9.24e-10	RNA degradation (8)	KEGG	2.94e-06
Cytochrome P450 ,CYP705A(4)	Gfam	3.32e-07	Module: lightcyan (150 probsetIDs)		
Module: grey (1098 probsetIDs)			Putative targets of At5g25610_3237 (3)	MIR	9.48e-05
target genes TF: LEC2 (8)	TFT	1.51e-06	target genes of TF: AP2 (6)	TFT	4.45e-4
tify family (7)	Gfam	3.48e-05	Lipid Metabolism Gene Families, Phosphatidylinositol 4-kinase family (2)	Gfam	1.9e-4
Module: grey60 (144 probsetIDs)			RNA degradation (4)	KEGG	2.18e-4
C2C2-CO-like TF Family (5)	Gfam	7.94e-07	E3 - HECT family (2)	Gfam	1.12e-3

است (Nuruzzaman *et al.*, 2015). دو عامل رونویسی محتوی دمین NAC پاسخ‌دهنده به JA، ANACC019 و ANACC055 در آراییدوپسیس یافت شده است که در پایین دست MYC2 عمل می‌کنند تا پاسخ‌های دفاعی JA را تنظیم کنند (Bu *et al.*, 2008). آنالیز GO برای ماژول خاکستری ۶۰ (Gray60) نشان داد که این ماژول نیز دارای ۲۳ ژن

خانواده NAC (NAM/ATAF/CUC) نیز یکی از بزرگترین خانواده‌های ژنی در گیاهان است و نقش‌های کلیدی در پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارند. علاوه بر این مشخص شده است که این عامل رونویسی در بسیاری از فرآیندهای نمو نیز نقش دارد که شامل نمو بذر، نمو جنین، تشکیل مریستم انتهایی، پیری برگ و نمو شاخه

تنظیمی مشترکی میان آنها وجود دارد. نتایج نشان داد که این ژن‌ها به طور مشترک توسط هفت عامل رونویسی تنظیم می‌شوند که شامل RAV1، WRKY71، ATMYC2، DOF1، HB33، MYB1 و DOF2.4 می‌باشد. گزارش شده است که فعالیت WRKY71-1D سبب تسریع گلدهی از طریق اتصال به W-box در راه‌اندازهای *LFY* و *FT* در گیاه آراییدوپسیس می‌شود و بدینوسیله تعیین‌کننده زمان گلدهی است (Yu *et al.*, 2016).

با فعالیت تنظیم‌کنندگی رونویسی (GO:0003700) است. همانگونه که در شکل ۳ مشخص است، این ژن‌ها دارای فعالیت تنظیم‌نمو گل (از جمله *COL1*، *COL2* و *AGL31*)، فعالیت پاسخ‌دهندگی به تنش‌های غیر زیستی و پاسخ دهنده به نور هستند. همچنین پنج ژن نیز عضو خانواده C2C2-CO-like TF می‌باشند که نتایج GSEA (جدول ۲) نیز معنی‌داری آن را تأیید کرده است. آنالیز راه‌انداز برای این ۲۳ ژن انجام شد تا مشخص شود که چه عناصر



شکل ۲. نمودار تعداد عامل‌های رونویسی موجود در خانواده‌های ژنی موجود در ماژول سیاه

تعدادی از عامل‌های رونویسی دارای ارتباط می‌باشند. نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان‌دهنده است که عامل‌های رونویسی در پاسخ به JA به طور همزمان فعالیت می‌کنند و بیان سایر ژن‌ها را در پاسخ به JA تحت تأثیر قرار می‌دهند.

فتوستتوز

ماژول قرمز (red) به فرآیند فتوستتوز (GO:0015979) اختصاص یافته است. بیشتر عبارت‌های به کار رفته در GO برای این ماژول فرآیندهای زیستی مرتبط با

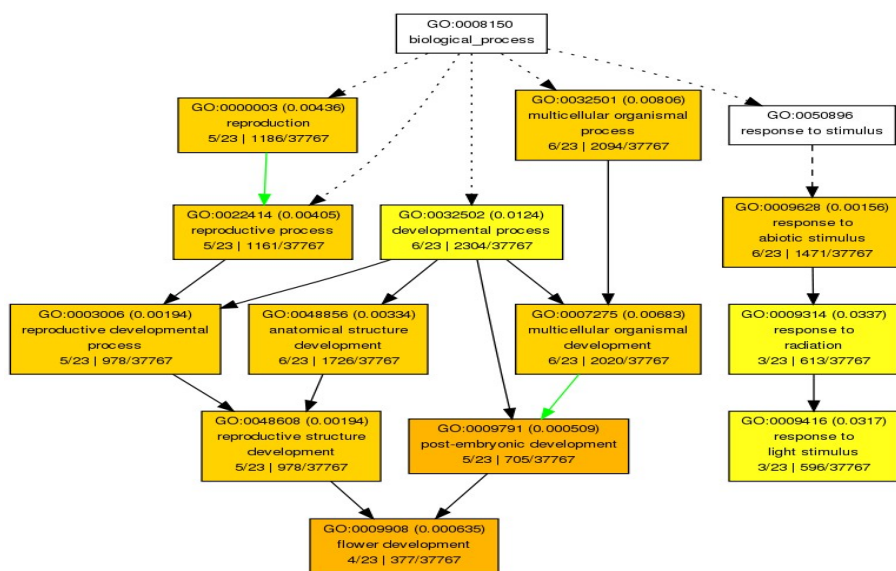
همچنین عامل رونویسی MYC2 یک عضو از خانواده bHLH قادر به اتصال به نواحی تنظیمی بالادست این ژن‌ها می‌باشد و تنظیم‌کننده کلیدی در مسیر سیگنال فیتوهورمون JA است. عامل رونویسی AtMYC2 به عنوان تنظیم‌کننده در مسیرهای سیگنال نور، ABA و JA در گیاهان شناخته شده است (Yadav *et al.*, 2005) و ژن‌های پاسخ به زخم و سیستم دفاعی پاتوژن پاسخ‌دهنده به JA را تنظیم می‌کند (Dombrecht *et al.*, 2007). همانگونه که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود فقط

فتوستنتز را توصیف می‌کند. برای نمونه به واکنش نوری در فتوستنتز (GO:0019684)، واکنش تاریکی در فتوستنتز (GO:0019685)، تنظیم فتوستنتز (GO:0010109)، تولید NADPH (GO:0006740)، فرآیند ساخت کلروفیل II (GO:0015995)، فرآیند متابولیسم پیرووات (GO:0006090)، فرآیند ساخت پیگمان‌های tetrapyrrole و porphyrin (GO:0006779) و فرآیند متابولیسم هگزوزها (GO:0033014)، فرآیند کاتابولیک مونوساکارید (GO:0019320) و زنجیره انتقال الکترون (GO:0046365) می‌توان اشاره کرد. همان‌گونه که در جدول ۳ نیز مشاهده می‌شود بیشتر عبارات‌های معنی‌دار یافت شده برای آنالیز GSEA با فتوستنتز در ارتباط هستند که تأییدی برای آنالیز GO می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که گیاه توتون در مواجهه با آفات از طریق متابولیت‌های مرتبط با JA، فتوستنتز را کاهش می‌دهند. در این حالت سیگنال لیپوکسیژناز با زنجیره انتقال الکترون دستگاه فتوستنتز دارای ارتباط می‌باشد.

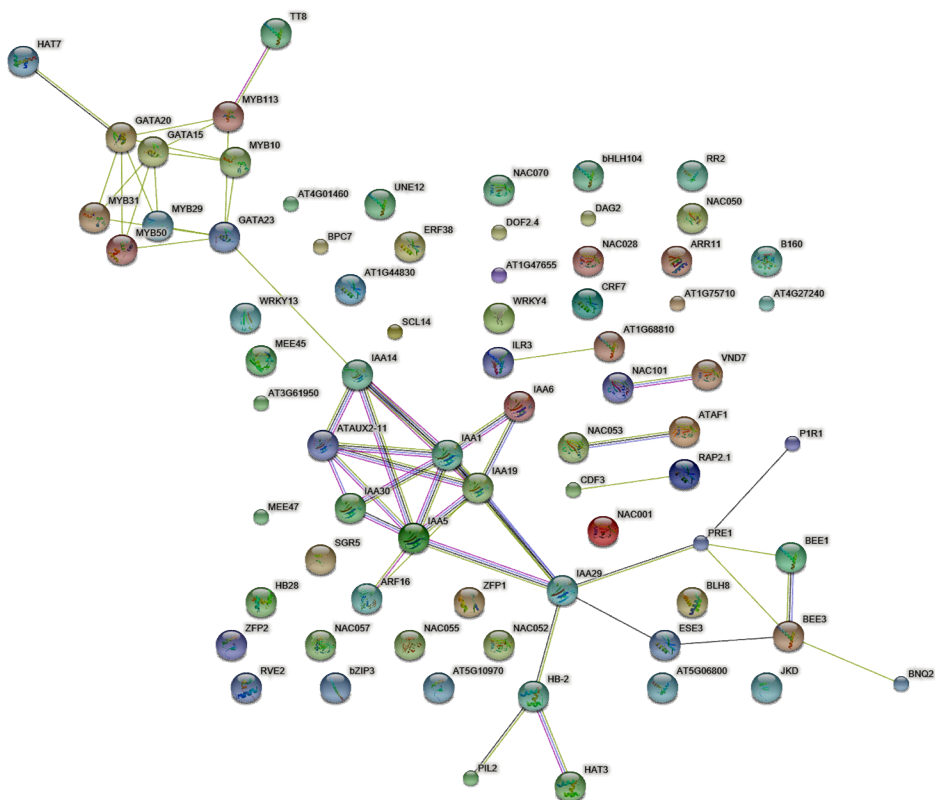
(Nabity *et al.*, 2012). هورمون JA در گیاه *Cajanus cajan* در شرایط سمی یون مس به تجمع کلروفیل II و کارتنوئید کمک کرده و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همانند سوپراکسید دیسموتازها و پراکسیدازها را کنترل می‌کند تا اثرات مخرب اکسیژن‌های فعال تولید شده توسط این فلز سنگین را کاهش دهد (Poonam *et al.*, 2013). از سوی دیگر نشان داده شده است که متیل‌جاسمونات در برگ‌های بالغ موجب از بین رفتن کلروفیل‌ها، سرکوب سنتز و تجزیه پروتئین‌های دستگاه فتوستنتزی می‌شود (Wierstra & Kloppstech, 2000). سرکوب ژن‌های فتوستنتزی به عنوان پاسخ گیاهی حفاظت شده در برابر تنش‌های زیستی معرفی شده است. ترارسانی JA در طی انتقال سوخت‌وساز از فاز رشدی به حالت دفاعی فتوستنتز را بهینه می‌سازد (Attaran *et al.*, 2014). همچنین مشخص شده است که کاربرد متیل‌جاسمونات تحت تنش خشکی فتوستنتز را افزایش داد و از این طریق وضعیت آب و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را در گیاه گندم بهبود می‌دهد (Ma *et al.*, 2014).

جدول ۳. خلاصه‌ای از نتایج GSEA برای ماژول قرمز به دست آمده از شبکه هم‌بیانی متیل‌جاسمونات با $FDR \leq 0.05$

Description of gene set (No of probsetIDs in red module)	category	p-value
Metabolic pathways(153)	KEGG	1.26e-22
Photosynthesis(32)	KEGG	1.07e-17
Photosynthesis - antenna proteins (14)	KEGG	9.96e-11
Biosynthesis of alkaloids derived from ornithine, lysine and nicotinic acid (31)	KEGG	4.66e-09
Biosynthesis of plant hormones (43)	KEGG	1.17e-08
Carbon fixation in photosynthetic organisms (20)	KEGG	1.74e-08
Biosynthesis of alkaloids derived from histidine and purine (28)	KEGG	1.34e-07
Pentose phosphate pathway(15)	KEGG	3.65e-07
Biosynthesis of alkaloids derived from shikimate pathway (28)	KEGG	3.92e-07
Chloroplast and Mitochondria gene families ,Chlorophyll a/b-binding protein family (11)	Gfam	2.76e-08
Glycolysis / Gluconeogenesis (18)	KEGG	2.18e-06
Biosynthesis of terpenoids and steroids (28)	KEGG	2.66e-06
Biosynthesis of alkaloids derived from terpenoid and polyketide (24)	KEGG	4.67e-06
Biosynthesis of phenylpropanoids (31)	KEGG	1.05e-05
Carotenoid biosynthesis (8)	KEGG	5.88e-05
Fructose and mannose metabolism (10)	KEGG	2.03e-4
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis (8)	KEGG	4.22e-4
Protein export (9)	KEGG	6.07e-4
Ascorbate and aldarate metabolism(7)	KEGG	1.87e-3



(الف)



(ب)

شکل ۳. الف) نتایج هستی‌شناسی ژن برای عامل‌های رونویسی ماژول خاکستری ۶۰ (GO:0003700). در هر کادر مستطیل شکل به ترتیب GO-ID، p-value، عبارت توصیف‌کننده GO و تعداد ژن‌های مورد بررسی دخیل در فرآیند بیولوژیکی خاص / تعداد کل ژن‌های مورد بررسی / تعداد ژن‌های فرآیند بیولوژیکی خاص در آراییدوپسیس / تعداد کل ژن‌ها در آراییدوپسیس بیان شده است. ب) شبکه ژنی پیش‌بینی شده برای عامل‌های رونویسی ماژول سیاه (GO:0045449) ترسیم شده در سایت string، خطوط ترسیم شده بین ژن‌ها بیانگر ارتباط میان ژن‌ها می‌باشد.

۲۹ ژن در ماژول قرمز به سرما (GO:0009409) پاسخ می‌دهند که بیانگر اهمیت فتوستنز در پاسخ گیاهان به سرما می‌باشد. ۱۵ ژن پاسخ‌دهنده به سرما در فرآیند فتوستنز، واکنش‌های نوری (GO:0019684) و ۱۳ ژن آن در فرآیند کاتابولیکی گلوکز (GO:0006007) و ۱۹ ژن در فرآیند متابولیکی گلوکز (GO:0005975) نقش دارند. بر این اساس می‌توان گفت که JA پاسخ به سرما را در گیاهان توسط ژن‌های درگیر در فتوستنز و متابولیسم قندها کنترل می‌کند. مطالعات پیشین نیز تعیین کرده‌اند که تیمار با متیل‌جاسمونات در گیاهچه‌های گندم سبب افزایش تحمل به سرما همراه با افزایش در فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و محتوای پروتئینی محلول در گیاهچه‌ها می‌شود (Qi et al., 2005). علاوه بر این، سوپسترای ساخت متیل‌جاسمونات، α -لینولئیک‌اسید، از گالاکتولیپیدهای کلروپلاست‌ها مشتق می‌شود (Wasternack & Hause, 2013). مطالعه‌ای در گیاه گوجه‌فرنگی نشان داده است که از بین رفتن عمل ژن *FAD* کلروپلاستی سبب کاهش مقدار α -لینولئیک‌اسید و تجمع JA در پاسخ‌های دفاعی می‌شود (Li et al., 2003) بنابراین احتمالاً ذخائر α -لینولئیک‌اسید کلروپلاستی برای سنتز JA القا شده توسط تنش ضروری می‌باشد. ساخت متیل‌جاسمونات و α -لینولئیک‌اسید در طی فرآیند خوگیری به سرما در گیاه *Camellia japonica* افزایش می‌یابد (Li et al., 2016). مسیر انتقال پیام اکتادکانوئید یا JA نقش مهمی در بروز پاسخ‌های دفاعی گیاهان علیه تنش‌های ناشی از عوامل زنده و غیر زنده ایفا می‌کند. JA و مشتقات آن نظیر متیل‌جاسمونات فرآورده‌های نهایی مسیر اکتادکانوئید هستند که پس از طی مراحل مختلف ناشی از عملکرد آنزیم‌های متعدد بر روی اسیدهای چرب اشباع نشده موجود در کلروپلاست سلول‌های گیاهی و اکسیداسیون آنها تولید می‌شوند و در بروز پاسخ‌های دفاعی گیاه نقش دارند (Turner et al.,

2002). احتمالاً JA تنظیم‌کننده کلیدی در کنترل فرآیند فتوستنز می‌باشد، هرچند این پاسخ‌ها در شرایط مختلف متفاوت می‌باشد. تنش سرما تعدادی از ژن‌های مسیر پیام‌رسانی و ساخت هورمون‌های ABA و JA را فعال می‌کند و در نهایت موجب تجمع ABA و JA می‌شود. هورمون JA همچنین تحمل به سرما را از طریق تنظیم‌آبشار ICE-CBF/DREB1 افزایش می‌دهد، در حالی که ترکیبات درگیر در ساخت و ترانس‌سانی ABA برای بیان ژن‌های *COR* در پاسخ به سرما ضروری می‌باشند (Yanru Hu et al., 2013). اساس یک نظریه احتمالاً JA می‌تواند جایگزینی برای آبسزیک‌اسید در طی تنش سرما باشد تا رشد را سرکوب کند. زیرا JA مانع رشد و تقسیم سلولی می‌شود (Kosová et al., 2012).

مرگ برنامه‌ریزی شده سلول

آنالیز GO برای ماژول فیروزه‌ای فسفری (royalblue) (حاوی ۱۱۸ ژن) نشان داد که پاسخ‌های خودایمنی (GO:0045087) و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (GO:0012501) و GO:0006915 را به‌طور هم‌زمان کنترل می‌کند. ژن‌های *at_260735*، *at_258537*، *at_264885_s*، *at_248835*، *at_250419* و *at_262126* به‌طور مشترک در مرگ برنامه‌ریزی شده و پاسخ‌های خودایمنی سلول در آراییدوپسیس شرکت می‌کنند. علاوه بر این، ژن‌های *at_248169*، *at_259560*، *at_245265*، *at_249890*، *at_265837* و *at_259561* به سالیسیلیک‌اسید (SA) (GO:0009751) پاسخ می‌دهند. مشخص شده است که JA سنتز شده در پاسخ به تنش‌ها، سبب القا اکسیژن‌های فعال و متابولیت‌های ثانویه همچون فنول‌ها شده و گیاهان از آنها به عنوان پاسخ‌های دفاعی استفاده می‌کنند. در نهایت JA موجب تغییراتی در میتوکندری شده و با القا

Khokon *et al.*, 2011; Van der Does *et al.*,)
 می‌کند (Zhang & Xing, 2008; Soares *et al.*,)
 (2010; Petrov *et al.*, 2015). اکسیژن‌های فعال
 دارای خاصیت اکسیدکنندگی بالایی هستند و با
 بسیاری از ملکول‌های زیستی واکنش می‌دهند و از
 این طریق موجب تخریب آنها می‌شوند (Petrov &
 Van Breusegem, 2012). با وجود سمیت برای
 سلول، اکسیژن‌های فعال نقش دوگانه‌ای را در سلول
 می‌تواند داشته باشند و این وابسته به غلظت، مکان و
 مدت زمان عمل و همچنین تنش‌های پیشین است
 (Miller *et al.*, 2010). به‌طوریکه اکسیژن‌های
 فعال در غلظت‌های پایین به‌عنوان ملکول‌های
 پیام‌رسان برای پاسخ به تنش‌ها و در غلظت‌های بالا
 به‌عنوان تهدیدی برای سلول و آغازکننده مرگ
 برنامه‌ریزی شده سلول شناخته می‌شوند (Gechev
 & Hille, 2005). مرگ برنامه‌ریزی شده سلول
 نقش مهمی در فرآیندهای رشد و نمو دارد و همچنین
 توسط انواع تنش‌های زیستی و غیر زیستی القا می‌شود.
 مرگ سلولی القا شده توسط تنش عملکرد و رشد زایشی
 گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد، بنابراین از اهمیت
 بالایی برخوردار است (Petrov *et al.*, 2015).
 متیل‌جاسمونات در جانوران نیز به صورت گزینشی، در
 سلول‌های سرطانی سبب متوقف شدن چرخه سلولی و
 القا مرگ سلولی می‌شود و به همین علت به عنوان یک
 داروی ضد سرطان مورد مطالعه قرار گرفته است
 (Mutian Zhang *et al.*, 2016).
 مسیر ترانس‌سانی هورمون‌های SA و JA در
 مواجهه با پاتوژن‌های مختلف ارتباطی آنتاگونیستی را
 نشان داده‌اند (Robert-Seilaniantz *et al.*,)
 (2011). این ارتباط توسط عامل‌های رونویسی
 NPR1 و ORA59 تنظیم می‌شوند (Spoel *et al.*,)
 (2003; Van der Does *et al.*, 2013). افزایش
 SA چه بصورت طبیعی داخل گیاه و چه بصورت
 تیمار موجب افزایش تولید انواع اکسیژن‌های فعال
 همراه با افزایش کلسیم سیتوزولی می‌شوند

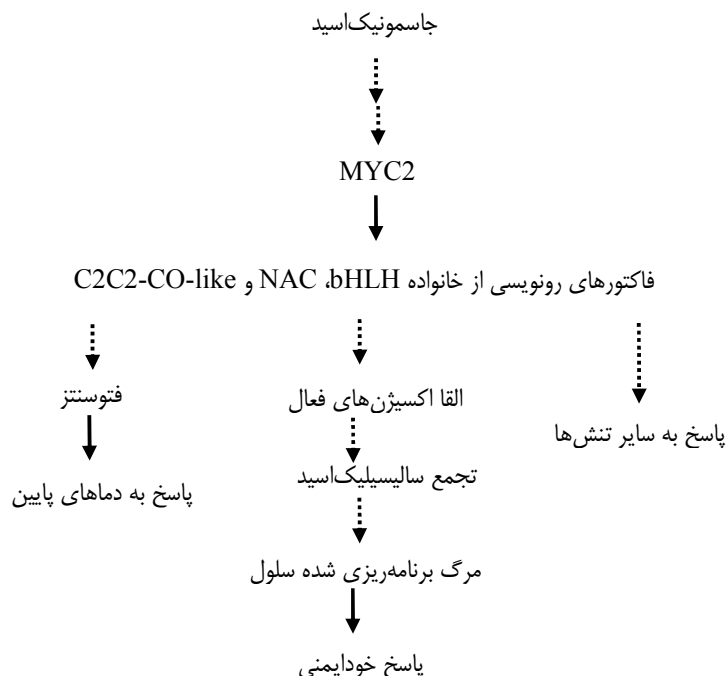
افزایش اکسیژن‌های فعال منجر به تجمع SA
 می‌شود و پاسخ‌های مرگ سلول‌های گیاهی را تنظیم
 می‌کنند (Overmyer *et al.*, 2003). بنابراین مرگ
 سلولی در گیاهان احتمالاً از طریق برهمکنش میان
 SA و JA کنترل می‌شود (Overmyer *et al.*,)
 (2003; Xu and Brosché, 2014) و مرگ سلولی
 القا شده به‌وسیله JA احتمالاً توسط برهمکنش
 SA/JA سرکوب می‌گردد (Xu & Brosché,)
 (2014). حضور ژن‌های پاسخ‌دهنده به SA در این
 ماژول می‌تواند تأکیدی برای این نکته باشد.

پاسخ به تنش‌های مختلف

ماژول فیروزه‌ای (turquoise) بزرگترین ماژول در
 این شبکه هم‌بیانی می‌باشد. این ماژول را ماژول
 تنش می‌توان نامید زیرا بیشتر ژن‌های آن (۵۳۵ ژن)
 پاسخ‌دهنده به تنش (GO:0006950) هستند که در
 این میان ۳۴۰ ژن به القاگرهای غیرزیستی
 (GO:0009628) و ۱۹۲ ژن به القاگرهای زیستی
 (GO:0009607) پاسخ می‌دهند. این ژن‌ها پاسخ
 دهنده به تنش اسمزی (GO:0006970) حاوی ۱۳۰
 ژن، تنش شوری (GO:0009651) حاوی ۱۲۴ ژن،
 کم‌آبی (GO:0009414) حاوی ۵۶ ژن، زخم
 (GO:0009611) حاوی ۴۹ ژن، یون کادمیوم
 (GO:0009617) حاوی ۸۵ ژن، و قارچ‌ها (GO:0009620)
 حاوی ۵۶ ژن هستند. علاوه‌براین ۱۱۲ ژن به دما
 (GO:0009266) پاسخ داده که ۷۹ ژن توسط سرما
 (GO:0009409) القا می‌شود. همچنین، این ماژول حاوی ۲۵
 ژن تنظیم‌کننده پاسخ به تنش (GO:0080134)
 می‌باشد. همان‌گونه که از این نتایج مشخص است
 این هورمون در بیشتر تنش‌ها تأثیرگذار است و
 احتمالاً مسیر مشخصی را در واکنش به تنش‌های
 مختلف فعال می‌کند.

هورمون کنترل می‌شوند که فتوستتر، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، پاسخ به تنش‌های مختلف و همچنین فرآیندهای متنوعی در ارتباط با لیپیدها (نتایج در اینجا بیان نشده است) را شامل می‌شود (شکل ۴).

مطالعات فراوانی بر روی بیان ژن‌های مرتبط با JA صورت گرفته است اما ارتباط بین ژن‌های تحت تأثیر JA کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. آنالیز شبکه صورت گرفته در اینجا برای هورمون JA نشان داد که فرآیندهای زیادی به وسیله این



شکل ۴. خلاصه‌ای از نتایج به دست آمده از شبکه هم‌بیانی هورمون جاسمونیک اسید در آرکیدوپسیس

پایین از طریق کنترل فتوستتر و متابولیسم قندها کنترل می‌کند که باید در مطالعات آینده مدنظر قرار گیرد. علاوه بر این هورمون JA پاسخ‌های خودایمنی را از طریق کنترل مرگ برنامه‌ریزی شده سلول کنترل می‌کند و از طریق می‌تواند در تجمع هورمون سالیسیلیک اسید و تولید گونه‌هایی از اکسیژن فعال می‌تواند در تنش‌های غیرزیستی نیز نقش داشته باشد.

تعداد زیادی عامل رونویسی، از جمله ۱۱ ژن از خانواده NAC و ۱۲ ژن از خانواده bHLH، برای تنظیم پاسخ‌های JA معرفی شدند که در مهندسی ژنتیک و مطالعات مسیرهای زیستی JA می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. پنج ژن از اعضای خانواده C2C2-CO-like TF نیز در کنترل پاسخ‌های JA نقش دارند که در پایین دست ژن MYC2 عمل می‌کنند. احتمالاً JA پاسخ‌های گیاه را به دماهای

REFERENCES

Andorf CM, Cannon EK, Portwood IJL, Gardiner JM, Harper LC, Schaeffer ML, Braun BL, Campbell DA, Vinnakota AG, Sribalusu VV, Huerta

M, Cho KT, Wimalanathan K, Richter JD, Mauch ED, Rao BS, Birkett SM, Sen TZ, Lawrence-Dill CJ (2015) MaizeGDB update: new tools, data

- and interface for the maize model organism database. *Nucleic Acids Res.* 44(D1): D1195-D1201.
- Attaran E, Major IT, Cruz JA, Rosa BA, Koo AJ, Chen J, Kramer DM, He SY, Howe GA (2014) Temporal dynamics of growth and photosynthesis suppression in response to jasmonate signaling. *Plant physiol.* 165(3): 1302-1314.
- Balbi V, Devoto A (2008) Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol.* 177(2): 301-318.
- Bergmann S, Ihmels J, Barkai N (2004) Similarities and differences in genome-wide expression data of six organisms. *PLoS Biol.* 2(1): 85-93.
- Bu Q, Jiang H, Li C-B, Zhai Q, Zhang J, Wu X, Sun J, Xie Q, Li C (2008) Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell res.* 18(7): 756-767.
- Cerrudo I, Keller MM, Cargnel MD, Demkura PV, de Wit M, Patitucci MS, Pierik R, Pieterse CM, Ballaré CL (2012) Low red/far-red ratios reduce *Arabidopsis* resistance to *Botrytis cinerea* and jasmonate responses via a COI1-JAZ10-dependent, salicylic acid-independent mechanism. *Plant Physiol.* 158(4): 2042-2052.
- Chen HY, Hsieh EJ, Cheng MC, Chen CY, Hwang SY, Lin TP (2016) ORA47 (octadecanoid-responsive AP2/ERF-domain transcription factor 47) regulates jasmonic acid and abscisic acid biosynthesis and signaling through binding to a novel cis-element. *New Phytol.* 211(2): 599-613.
- Chen YA, Wen YC, Chang WC (2012) AtPAN: an integrated system for reconstructing transcriptional regulatory networks in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics.* 13(1): 85.
- Dombrecht B, Xue GP, Sprague SJ, Kirkegaard JA, Ross JJ, Reid JB, Fitt GP, Sewelam N, Schenk PM, Manners JM (2007) MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 19(7): 2225-2245.
- Du Z, Zhou X, Ling Y, Zhang Z, Su Z (2010) agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic acids res.* doi: 10.1093/nar/gkq310.
- Duek PD, Fankhauser C (2005) bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling. *Trends Plant Sci.* 10(2): 51-54.
- Feng X-M, Zhao Q, Zhao L-L, Qiao Y, Xie X-B, Li H-F, Yao Y-X, You C-X, Hao Y-J (2012) The cold-induced basic helix-loop-helix transcription factor gene *MdCibHLLH1* encodes an ICE-like protein in apple. *BMC plant Biol.* doi: 10.1186/1471-2229-12-22.
- Fernández-Calvo P, Chini A, Fernández-Barbero G, Chico J-M, Gimenez-Ibanez S, Geerinck J, Eeckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla JM (2011) The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell.* 23(2): 701-715.
- Gechev TS, Hille J (2005) Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J. cell biol.* 168(1): 17-20.
- Hopper DW, Ghan R, Schlauch KA, Cramer GR (2016) Transcriptomic network analyses of leaf dehydration responses identify highly connected ABA and ethylene signaling hubs in three grapevine species differing in drought tolerance. *BMC Plant Biol.* doi:10.1186/s12870-016-0804-6.
- Hu P, Zhou W, Cheng Z, Fan M, Wang L, Xie D (2013) JAV1 controls jasmonate-regulated plant defense. *Mol. cell.* 50(4): 504-515.
- Hu Y, Jiang L, Wang F, Yu D (2013)

- Jasmonate regulates the inducer of CBF expression—c-repeat binding factor/DRE binding factor1 cascade and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 25(8): 2907-2924.
- Jiang Y, Liang G, Yang S, Yu D (2014) *Arabidopsis* WRKY57 functions as a node of convergence for jasmonic acid—and auxin-mediated signaling in jasmonic acid—induced leaf senescence. *Plant Cell*. 26(1): 230-245.
- Khokon M, Okuma E, Hossain MA, Munemasa S, Uraji M, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y (2011) Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*. 34.
- Kobayashi Y, Sadhukhan A, Tazib T, Nakano Y, Kusunoki K, Kamara M, Chaffai R, Iuchi S, Sahoo L, Kobayashi M, Hoekenga OA, Koyama H (2016) Joint genetic and network analyses identify loci associated with root growth under NaCl stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*. 39(4): 918-934.
- Kosová K, Prášil IT, Vítámvás P, Dobrev P, Motyka V, Floková K, Novák O, Turečková V, Rolčík J, Pešek B (2012) Complex phytohormone responses during the cold acclimation of two wheat cultivars differing in cold tolerance, winter Samanta and spring Sandra. *J. plant physiol*. 169(6): 567-576.
- Langfelder P, Horvath S (2008) WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC bioinformatics*. 9(1): 559.
- Li C, Liu G, Xu C, Lee GI, Bauer P, Ling H-Q, Ganai MW, Howe GA (2003) The tomato suppressor of prosystemin-mediated responses2 gene encodes a fatty acid desaturase required for the biosynthesis of jasmonic acid and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant Cell*. 15(7): 1646-1661.
- Li Q, Lei S, Du K, Li L, Pang X, Wang Z, Wei M, Fu S, Hu L, Xu L (2016) RNA-seq based transcriptomic analysis uncovers α -linolenic acid and jasmonic acid biosynthesis pathways respond to cold acclimation in *Camellia japonica*. *Sci. Rep.* doi: 10.1038/srep36463.
- Lozano-Durán R, García I, Huguet S, Balzergue S, Romero LC, Bejarano ER (2012) Geminivirus C2 protein represses genes involved in sulphur assimilation and this effect can be counteracted by jasmonate treatment. *Eur. J. Plant Pathol*. 134(1): 49-59.
- Lyons R, Manners JM, Kazan K (2013) Jasmonate biosynthesis and signaling in monocots: a comparative overview. *Plant Cell Rep*. 32(6): 815-827.
- Ma C, Wang Z, Zhang L, Sun M, Lin T (2014) Photosynthetic responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) to combined effects of drought and exogenous methyl jasmonate. *Photosynthetica*. 52(3): 377-385.
- Mandaokar A, Thines B, Shin B, Markus Lange B, Choi G, Koo YJ, Yoo YJ, Choi YD, Choi G, Browse J (2006) Transcriptional regulators of stamen development in *Arabidopsis* identified by transcriptional profiling. *Plant J*. 46(6): 984-1008.
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ*. 33(4): 453-467.
- Moon J, Zhu L, Shen H, Huq E (2008) PIF1 directly and indirectly regulates chlorophyll biosynthesis to optimize the greening process in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 105(27): 9433-9438.
- Moschen S, Higgins J, Di Rienzo JA, Heinz RA, Paniego N, Fernandez P (2016) Network and biosignature analysis for the integration of transcriptomic and metabolomic data to characterize leaf senescence process in sunflower. *BMC Bioinformatics*.

- doi:10.1186/s12859-016-1045-2.
- Mueller S, Hilbert B, Dueckershoff K, Roitsch T, Krischke M, Mueller MJ, Berger S (2008) General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 20(3): 768-785.
- Nabity PD, Zavala JA, DeLucia EH (2012) Herbivore induction of jasmonic acid and chemical defences reduce photosynthesis in *Nicotiana attenuata*. *J. Exp. Bot.* 64(2):685-94.
- Nakata M, Mitsuda N, Herde M, Koo AJ, Moreno JE, Suzuki K, Howe GA, Ohme-Takagi M (2013) A bHLH-type transcription factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 25(5): 1641-1656.
- Nuruzzaman M, Sharoni AM, Kikuchi S (2015) Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Front Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2013.00248.
- Omranian N, Kleessen S, Tohge T, Klie S, Basler G, Mueller-Roeber B, Fernie AR, Nikoloski Z (2015) Differential metabolic and coexpression networks of plant metabolism. *Trends Plant Sci.* 20(5): 266-268.
- Overmyer K, Brosché M, Kangasjärvi J (2003) Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci.* 8(7): 335-342.
- Petrov V, Hille J, Mueller-Roeber B, Gechev TS (2015) ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Front. Plant Sci.* 6: 69.
- Petrov VD, Van Breusegem F (2012) Hydrogen peroxide-a central hub for information flow in plant cells. *AoB plants*. doi: 10.1093/aobpla/pls014.
- Poonam S, Kaur H, Geetika S (2013) Effect of jasmonic acid on photosynthetic pigments and stress markers in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. seedlings under copper stress. *AJPS.* 4(4): 817.
- Qi F, Li J, Duan L, Li Z (2005) Inductions of coronatine and MeJA to low-temperature resistance of wheat seedlings. *Acta Bot. Boreali-Occidentalia Sinica.* 26(9): 1776-1780.
- Reinbothe C, Springer A, Samol I, Reinbothe S (2009) Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. *FEBS J.* 276(17): 4666-4681.
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JD (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49: 317-343.
- Schaefer RJ, Michno J-M, Myers CL (2016) Unraveling gene function in agricultural species using gene co-expression networks. *Biochim. Biophys. Acta.* 1860(1):53-63.
- Seo JS, Joo J, Kim MJ, Kim YK, Nahm BH, Song SI, Cheong JJ, Lee JS, Kim JK, Choi YD (2011) OsbHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice. *Plant J.* 65(6): 907-921.
- Serin EAR, Nijveen H, Hilhorst HWM, Ligterink W (2016) Learning from Co-expression Networks: Possibilities and Challenges. *Front. Plant Sci.* doi:10.3389/fpls.2016.00444.
- Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu F-F, Sharon M, Browse J (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature.* 468(7322): 400-405.
- Silva AT, Ribone PA, Chan RL, Ligterink W, Hilhorst HWM (2016) A predictive coexpression network identifies novel genes controlling the

- seed-to-seedling phase transition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 170(4): 2218-2231.
- Soares AMdS, Souza TFd, Jacinto T, Machado OLT (2010) Effect of methyl jasmonate on antioxidative enzyme activities and on the contents of ROS and H₂O₂ in *Ricinus communis* leaves. *Braz. J. Plant Physiol.* 22(3): 151-158.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux J-P, Brown R, Kazan K (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate-and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell.* 15(3): 760-770.
- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP (2014) STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids res.* doi: 10.1093/nar/gku1003.
- Takehisa H, Sato Y, Antonio B, Nagamura Y (2015) Coexpression network analysis of macronutrient deficiency response genes in rice. *Rice* doi:10.1186/s12284-015-0059-0.
- Tantong S, Pringsulaka O, Weerawanich K, Meeprasert A, Rungrotmongkol T, Sarnthima R, Roytrakul S, Sirikantaramas S (2016) Two novel antimicrobial defensins from rice identified by gene coexpression network analyses. *Peptides.* 84: 7-16.
- Turner JG, Ellis C, Devoto A (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell.* 14: S153-S164.
- Van der Does D, Leon-Reyes A, Koornneef A, Van Verk MC, Rodenburg N, Pauwels L, Goossens A, Körbes AP, Memelink J, Ritsema T (2013) Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCO11-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. *Plant Cell.* 25(2):744-61.
- Wasternack C, Hause B (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* 111(6):1021-1058.
- Wierstra I, Kloppstech K (2000) Differential effects of methyl jasmonate on the expression of the early light-inducible proteins and other light-regulated genes in barley. *Plant physiol.* 124(2): 833-844.
- Xu E, Brosché M (2014) Salicylic acid signaling inhibits apoplastic reactive oxygen species signaling. *BMC Plant Biol.* doi:10.1186/1471-2229-14-155.
- Yadav V, Mallappa C, Gangappa SN, Bhatia S, Chattopadhyay S (2005) A basic helix-loop-helix transcription factor in *Arabidopsis*, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth. *Plant Cell.* 17(7): 1953-1966.
- Yang T, Hao L, Yao S, Zhao Y, Lu W, Xiao K (2016) TabHLH1, a bHLH-type transcription factor gene in wheat, improves plant tolerance to Pi and N deprivation via regulation of nutrient transporter gene transcription and ROS homeostasis. *Plant P Physiol. Biochem.* 104: 99-113.
- Yi X, Du Z, Su Z (2013) PlantGSEA: a gene set enrichment analysis toolkit for plant community. *Nucleic Acids Res.* 41(W1): W98-W103.
- Yu Y, Liu Z, Wang L, Kim SG, Seo PJ, Qiao M, Wang N, Li S, Cao X, Park CM (2016) WRKY71 accelerates flowering via the direct activation of FLOWERING LOCUS T and LEAFY in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 85 (1):96-106.
- Zhang B, Horvath S (2005) A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* doi: 10.2202/1544-6115.1128.
- Zhang JC, Zheng HY, Li YW, Li HJ, Liu X, Qin HJ, Dong LL, Wang DW

- (2016) Coexpression network analysis of the genes regulated by two types of resistance responses to powdery mildew in wheat. *Sci. Rep.* doi: 10.1038/srep23805.
- Zhang L, Xing D (2008) Methyl jasmonate induces production of reactive oxygen species and alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction and subsequent cell death. *Plant cell physiol.* 49(7): 1092-1111.
- Zhang M, Su L, Xiao Z, Liu X, Liu X (2016) Methyl jasmonate induces apoptosis and pro-apoptotic autophagy via the ROS pathway in human non-small cell lung cancer. *Am. J. Cancer Res.* 6(2): 187.