

بازسازی شبکه‌های ژنی و برهم‌کنش پروتئینی دخیل در پاسخ به تنش خشکی در برنج

احسان پورعابد^۱، زهرا سادات شبر^{۲*}

۱. کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی سیستم‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲. استادیار گروه زیست‌شناسی سیستم‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۲۳ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۵/۱۴)

Reconstruction of drought responsive gene and protein interaction networks in rice

Ehsan Pourabed¹, Zahra-Sadat Shobbar^{2*}

1. M.Sc., Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

(Received: Jan. 13, 2017 - Accepted: Aug. 5, 2017)

Abstract

Rice is one of the most valuable crops, and water deficiency is the most important constraint to rice production. Due to the complexity and multigenic characteristics of the drought tolerance trait, the objective of the current research were reconstruction of the involved gene networks and identification of the key genes in rice plants using microarray data analysis. To achieve the goal, all the differentially expressed genes (DEGs) with fold changes $\geq +2.5$ and ≤ -2.5 at drought stress compared to normal conditions were identified among all the microarray data-series in rice using Genevestigator online tools. Totally, 101 DEGs were identified and their gene regulatory as well as protein-protein interactions (PPIs) networks was reconstructed. The hub genes (genes with the most interactions) were distinguished using nine Cyto-hubba computational algorithms on Cytoscape software. Based on the hub analysis results, 14 unique (non-redundant) genes were identified as the most effective genes in response to drought stress and their co-expression networks were constructed. According to the gene ontology analysis of the DEGs, their co-expressed genes and the hub genes, regulation of transcription were among the major groups indicating the importance of transcription factors (TFs) roles in drought tolerance mechanism. Amongst the TFs, ABA-responsive binding factors (AREBs), AP2, bZIP, WRKY and MYB gene families were observed. We hope that the obtained results would be beneficial toward finding the smart strategies for drought tolerance improvement.

Keywords: Biological network, drought responsive genes, Hub gene, Microarray, *Oryza sativa*.

چکیده

برنج یکی از ارزشمندترین محصولات کشاورزی است. یکی از تأثیرگذارترین عوامل محدود کننده این محصول استراتژیک تنش خشکی می‌باشد. نظر به چند ژنی بودن تحمل به خشکی، هدف پژوهش حاضر بازسازی شبکه ژنی درگیر و شناسایی ژن‌های کلیدی مربوطه در برنج با استفاده از تجزیه و تحلیل داده‌های ریزآرایه بوده است. به همین منظور با استفاده از نرم‌افزار تحت وب Genevestigator تمامی ژن‌های دارای تغییر بیان بالاتر و مساوی ۲/۵ و پایین‌تر و مساوی ۲/۵- در حالت تنش خشکی نسبت به شرایط نرمال در بین تمامی آزمایشات ریزآرایه انجام شده در برنج شناسایی شدند. در مجموع ۱۰۱ ژن با تغییر بیان ≥ 2.5 و ≤ -2.5 شناسایی شد و شبکه تنظیم ژنی و برهم‌کنش پروتئینی برای آن‌ها رسم گردید. ژن‌های قطب (ژن‌های دارای بیشترین برهم‌کنش) با استفاده از ۹ الگوریتم محاسباتی Cyto-Hubba در نرم‌افزار Cytoscape شناسایی شدند. این امر منجر به شناسایی ۱۴ ژن غیر تکراری شد که به عنوان مؤثرترین ژن‌ها در پاسخ به تنش خشکی در نظر گرفته شدند و شبکه هم‌بیانی آن‌ها رسم گردید. بر اساس بررسی هستی‌شناسی ژن‌های دارای بیان افتراقی، ژن‌های هم بیان با آنها و ژن‌های قطب، تنظیم رونویسی از گروه‌های اصلی بود که نشان دهنده اهمیت عوامل رونویسی در مکانیسم تحمل به خشکی می‌باشد. در میان عوامل رونویسی می‌توان به عوامل پاسخ دهنده به تنش خشکی همچون خانواده‌های ژنی bZIP, AP2, WRKY, MYB و عوامل متصل شونده به عناصر پاسخ دهنده به ABA، اشاره نمود. امید است نتایج به‌دست آمده در راستای یافتن راهکارهایی هدفمند جهت افزایش تحمل به خشکی مفید واقع گردد.

واژه‌های کلیدی: تنش غیرزیستی، ریزآرایه، شبکه زیستی، ژن‌های پاسخ‌دهنده به خشکی، ژن قطب.

Rabbani *et al.*, 2003; Rabello *et al.*, 2008). در پژوهش‌های اخیر ثابت شده است که اصلاح گیاه در جهت تحمل به خشکی یا اجتناب از آن چالش بسیار سختی می‌باشد. این چالش سخت بیشتر به دلایلی همچون وابستگی شدید مکانیسم تحمل به تنش خشکی با محیط‌های زیستی مخصوص و ادغام روش‌های غربالگری زمانی و مکانی متعدد می‌باشد (Hu *et al.*, 2014; Weber *et al.*, 2012). علاوه بر این، مقابله با تنش خشکی، یک صفت با فشار انتخاب تکاملی قوی می‌باشد. بنابراین به طور معمول بسیاری از مکان‌های ژنی این صفت تنها بخش کوچکی از تنوع فنوتیپی^۶ را پوشش می‌دهند (Ravi *et al.*, 2011; Sandhu *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014). در نتیجه، ژنوتیپ قوی در محیط دارای انعطاف‌پذیری بالا، اثر بخشی جایگاه ژنی را در محیط‌های گوناگون کاهش می‌دهد. با این حال، شناسایی جایگاه ژنی که دارای تأثیرات مطلوب در تحمل نسبت به تنش خشکی در بین جمعیت‌های گوناگون و محیط‌های متنوع می‌باشد، می‌تواند اثرات ژن‌های هدف پایین دستی^۷ را کاهش دهد (Ahmed *et al.*, 2013; Makumburage *et al.*, 2013; Semagn *et al.*, 2013; Tardieu, 2011).

به هر حال، گردآوری ژن‌های پاسخ دهنده به تنش خشکی به خصوص آن دسته از این ژن‌ها که دارای تغییر بیان قابل توجه نسبت به شرایط نرمال هستند امری ضروری جهت پی بردن به یک تصویر جامع نسبت به عملکرد مجموعه این ژن‌ها در تحمل به تنش خشکی می‌باشد. بر همین اساس گام نخست استفاده از ابزارهای به نسبت جدیدی با کارایی به مراتب بالاتر از جمله ابزار تحت وب Genevestigator در گردآوری و تجزیه و تحلیل جامع ژن‌های مؤثر در این تنش می‌باشد (Hruz *et al.*

مقدمه

برنج یکی از با ارزش‌ترین گیاهان زراعی از لحاظ اقتصادی و اجتماعی، و به عنوان غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان به خصوص در کشورهای در حال توسعه شناخته می‌شود. یکی از تأثیرگذارترین عوامل محدود کننده این محصول استراتژیک به خصوص در همان کشورهای در حال توسعه ذکر شده همچون، ایران، هندوستان، پاکستان، بنگلادش و ... تنش‌های غیر زیستی و مهم‌ترین آن‌ها کمبود منابع آبی و وجود تنش خشکی می‌باشد (Maclean *et al.*, 2002). تحمل نسبت به تنش خشکی به عنوان یک صفت پیچیده خود شامل مجموعه تغییراتی شامل تغییرات فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی در سطح گیاه می‌باشد (Zhang, 2007). بعضی از این تغییرات در سطح سلول و بافت شامل: زودرسی، کاهش سطح برگ، پیچ خوردگی برگ، افزایش کارایی سیستم ریشه، کاهش پنجه‌زنی، کاهش تعرق، بسته شدن روزنه‌ها و تجمع آسموپروتکتان‌ها^۱ همچون پرولین^۲ و تری هالوز^۳ می‌باشند (Jin *et al.*, 2010).

جهت شناسایی ژن یا ژن‌های مسئول برای انجام هر یک از این واکنش‌ها نسبت به تنش خشکی مطالعات گسترده‌ای در سطح تمام گونه‌های گیاهی صورت گرفته است (Tran *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2010). در برنج نیز شناسایی ژن‌های پاسخ‌دهنده به خشکی با استفاده از بررسی پروفایل بیان همچون ریزآرایه^۴، برچسب‌های توالی بیان شده^۵ (ESTs)، RNA gel blot و qRT-PCR انجام شده است (Degenkolbe *et al.*, 2009).

1. Osmoprotectants

۲ Proline

۳ Trehalose

4. Microarray

5. Expression Sequence Tags (ESTs)

۶ Phenotypic variation

7. Downstream target genes

بیانی مشابهی نیز تحت شرایط مختلف باشند (Obayashi *et al.*, 2009).

از همین رو در این تحقیق تلاش شده است تا پس از گردآوری کامل تمامی ژن‌های دارای تغییر بیان بسیار بالا و پایین نسبت به تنش خشکی در برنج، بررسی ژن‌های قطب در شبکه برهم‌کنش پروتئینی و ترسیم شبکه‌های هم‌بیانی ژن، تعدادی از تغییرات فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی در سطح گیاه، پس از القای درک تنش خشکی، شناسایی و ارائه گردد. تا در نهایت بتوان، با انجام مجموعه این اعمال در این پژوهش، به دید روشن‌تری نسبت به عملکرد مکانیسم پیچیده تحمل گیاه برنج نسبت به خشکی با استفاده از ابزارهای دقیق، سریع و در دسترس دست یافت.

مواد و روش‌ها

شناسایی و استخراج ژن‌ها

با استفاده از ابزار جستجوی ژن^۴ نرم‌افزار تحت وب Genevestigator تمامی ژن‌های دارای تغییر بیان بالاتر و مساوی ۲/۵ و پایین‌تر و مساوی ۲/۵- در حالت تنش خشکی نسبت به شرایط نرمال در بین تمامی آزمایشات ریزآرایه انجام شده در برنج به دست آمد (جدول ۱) (Hruz *et al.*, 2008).

رسم شبکه ژنی

تمامی ژن‌های شناسایی شده، در نرم‌افزار Pathway Studio 9.0 و از طریق Plant database آن بررسی شد (Nikitin *et al.*, 2003). پس از جستجوی^۵ تمامی ژن‌ها توسط نرم‌افزار، همسایه‌های^۶ آن‌ها نیز به دست آمد. در نهایت نیز بر اساس کل ژن‌های شناسایی شده و همسایه‌ها، شبکه

Genevestigator دارای یک موتور جستجوی کارآمد و بزرگترین پایگاه داده بیان ژن در گیاهان می‌باشد. به استناد خود این وبسایت، رتبه یک ارجاع در بین تمامی ابزارهای بیان ژن در بخش زیست‌شناسی گیاهی در تمامی مجلات علمی معتبر (بیش از ۲۰۰۰ مورد) مربوط به این پایگاه می‌باشد.

گام بعدی پس از گردآوری تمامی این ژن‌ها، شناسایی ژن‌هایی با بیشترین ارتباط در سطح سلول می‌باشد. با تکمیل بسیاری از پروژه‌های ژنومی، توجه محققان از مطالعه انفرادی ژن‌ها و پروتئین‌ها به مطالعه برهم‌کنش این عناصر معطوف شده است. مطالعه و ساخت شبکه‌های برهم‌کنش از این جهت اهمیت دارد که عناصر در داخل سلول به تنهایی عمل نکرده و عملکرد و ویژگی آنان در عملکرد با سایر عناصر تعریف می‌گردد.

کشف و آنالیز فرآیندهای زیستی سلولی یکی از اهداف اصلی در دوره پساژنومی^۲ می‌باشد (Yeger-Lotem *et al.*, 2004). فرآیندهای سلولی به‌وسیله برهم‌کنش میان انواع مولکول‌های مختلف همچون پروتئین، DNA و متابولیت‌ها تنظیم می‌شوند (Fell *et al.*, 2000; Kepes *et al.*, 2002; Ouzounis *et al.*, 1998; Thieffry *et al.*, 2000). در نهایت، گام نهایی پس از شناسایی تمامی این ژن‌های دارای بیش‌ترین ارتباط، تجزیه و تحلیل این ژن‌ها و بررسی عملکرد آن‌ها در قالب شبکه‌های تنظیمی ژن همچون شبکه‌های هم‌بیانی ژن‌ها می‌باشد. یکی از روش‌های قدرتمند برای پیش‌بینی عملکرد ژن و (یا) شناسایی ژن‌هایی که دارای ارتباط عملکردی با ژن هدف هستند، تجزیه و تحلیل شبکه هم‌بیانی ژن^۳ می‌باشد. نظریه تجزیه و تحلیل هم‌بیانی ژن بر پایه این دیدگاه استوار است که ژن‌هایی با عملکرد مشابه باید دارای الگوهای

4. Gene search tool

Δ Look-up

ε Neighbors

1. https://genevestigator.com/gv/doc/intro_plant.jsp

2. Post-genomic

3. Gene Co-expression Network

ژنی بین آن‌ها در سلول بازسازی و رسم گردید.

جدول ۱. سری داده‌های ریزآرایه مورد استفاده در این پژوهش

No.	Series	Developmental stage	Tissue	Genotype	Reference
1	GSE42683	14-day seedling	Root	Dongjin (mutant) Dongjin (wild)	-
2	GSE23211	Pre anthesis stage	Flag leaf	PSARK::IPT (transgenic) and wild type	Peleg et al. 2011
3	GSE25176	Pre anthesis stage	Flag leaf	ZS97 (sensitive-Indica) IRAT109 (tolerant-Japonica)	-
4	GSE26280	Tillering stage	Leaf Root	DK151 (a drought tolerant line from IR64)	Wang et al. 2011
		Panicle elongation stage	Leaf Root		
		Booting stage	Leaf Panicle		
		Plant grown in a field	Leaf		
5	GSE24048	Plant grown in a field	Leaf	Azucena (sensitive) Bala (tolerant)	-
6	GSE6901	7-day seedling	Seedling	IR64 (drought-sensitive)	Jain et al. 2007 Jain et al. 2009 Sharma et al. 2009 Deveshwar et al. 2011 Sharna et al. 2014
					Sangram et al. 2011 Zhang et al. 2012
7	E-MEXP-2401	Seedling	Whole organism	IR64 (drought-sensitive) N22 (drought-tolerant)	

نهایت، نتایج حاصل از الگوریتم‌های مختلف با هم تلفیق شده و ژن‌های تکراری حذف شدند.

رسم شبکه هم‌بیانی ژن

با استفاده از ابزار هم‌بیانی ژن^۸ در نرم‌افزار تحت وب Genevestigator برای هر کدام از ژن‌هایی که به عنوان ژن قطب (دارای بیشترین برهم‌کنش) در شبکه برهم‌کنش پروتئینی شناخته شدند، در جهت مثبت، شبکه هم‌بیانی ژنی رسم گردید. همچنین، میزان هم‌بیانی ژن هدف^۹ با ۲۵ ژن دیگر به وسیله نسبت همبستگی پیرسون^{۱۰} در محدوده ۰/۵ تا ۰/۹ تعیین گردید.

ضریب همبستگی پیرسون برای یک نمونه آماری با $\{X_i, Y_i\}$ زوج داده به صورت رابطه ذیل تعریف می‌شود:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}}$$

^۸Gene Co-expression tool

^۹Target gene

^{۱۰}Pearson Correlation Coefficient

رسم شبکه برهم‌کنش پروتئینی (PPI)

فهرست نهایی ژن‌ها در نرم‌افزار Pathway Studio 9.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و فهرست برهم‌کنش پروتئینی تهیه شد. در مرحله‌ی بعد برای رسم شبکه برهم‌کنش پروتئینی و شناسایی ژن‌های مؤثر در این شبکه از نرم‌افزار Cytoscape و Cyto-Hubba^{۱۱} (Smoot *et al.*, 2011) پلاگین^{۱۲} آن استفاده شد (Chin *et al.*, 2014). لازم به ذکر می‌باشد که جهت شناسایی ژن‌های قطب^{۱۳} (۱۰ گره با بیشترین برهم‌کنش) در شبکه از ۹ الگوریتم محاسباتی Cyto-Hubba به نام‌های Degree، Radiality، Closeness، MCC^{۱۴}، MNC^{۱۵}، EPC^{۱۶}، Stress، و Betweenness BN استفاده شد.

^{۱۱} Protein-Protein Interaction (PPI)

^{۱۲} Plugin

^{۱۳} Hub

^{۱۴} Edge Percolated Component

^{۱۵} Maximum Neighborhood Component

^{۱۶} Mathews Correlation Coefficient

^{۱۷} Bottleneck

عوامل رونویسی در انتقال پیام، درون شبکه‌های ژنی پاسخ دهنده به تنش‌های غیر زیستی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند. این عوامل نه تنها به عنوان یک فعال‌کننده مولکولی برای بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده عمل می‌کنند، بلکه به عنوان یک عامل اصلی در فرآیندهای انتقال پیام در شبکه‌های زیستی نیز نقش ایفا می‌کنند (Shinozaki et al., 2007). در میان عوامل رونویسی می‌توان به عوامل پاسخ‌دهنده به تنش خشکی همچون، عوامل متصل‌شونده به عناصر پاسخ‌دهنده به ABA^۵ (WRKY، bZIP، AP2)، خانواده‌های ژنی MYB و اشاره نمود. پس از عوامل رونویسی از لحاظ تعداد می‌توان به پروتئین کینازها^۶ اشاره نمود. پروتئین کینازها آنزیم‌هایی هستند که کنترل‌کننده فرآیندهای مختلف سلولی از جمله پاسخ به محرک‌های محیطی می‌باشند (Manning et al., 2002). مطالعات بسیاری به جهت شناسایی نقش پروتئین کینازها در مقاومت به تنش خشکی در برنج انجام شده است. این مطالعات نشان‌دهنده وجود زیرخانواده‌هایی همچون MAPK^۷ و MAPKK^۸ در رابطه مستقیم با مقاومت به تنش ذکر شده در برنج می‌باشند (Rohila et al., 2007).

با استفاده از ۹۰۴ برهم‌کنش پروتئینی به دست آمده از نرم‌افزار Pathway Studio 9.0 شبکه برهم‌کنش پروتئینی توسط نرم‌افزار Cytoscape ترسیم گردید. همچنین با استفاده از ۹ الگوریتم ذکر شده، ۱۴ ژن با بیشترین برهم‌کنش در بین تمامی این برهم‌کنش‌های پروتئینی به دست آمد (شکل ۳). اطلاعات این ۱۴ ژن در جدول ۲ نشان داده شده است. علاوه بر این شبکه بیان و تنظیم ژنی بر اساس

بر همین اساس میانگین نمونه‌ها نیز به وسیله رابطه ذیل به دست می‌آید:

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i \quad \bar{Y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n Y_i$$

که هر کدام از اجزای دو رابطه فوق طبق عبارات ذیل تعریف می‌شوند:

n = تعداد تمامی نمونه‌های بیان

X = مقدار بیان ژن X

Y = مقدار بیان ژن Y

تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی (GO)

اطلاعات حاصل از بررسی هستی‌شناسی تمامی ژن‌ها شامل تمام ژن‌های شناسایی‌شده توسط Genevestigator، تمامی ژن‌های کلیدی شناسایی شده توسط الگوریتم‌های Cyto-Hubba و تمامی ژن‌های هم‌بیان شناسایی شده در شبکه‌های هم‌بیانی ژنی به وسیله نرم‌افزار Pathway Studio 9.0 استخراج شد. تمامی ژن‌های مورد بررسی بر اساس فرآیندهای بیولوژیکی^۱، گروه‌بندی و تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج و بحث

با استفاده از ابزار جستجوی ژن در Genevestigator و پس از حذف ژن‌های تکراری به دست آمده از نمونه‌های متفاوت تنش خشکی آزمایش‌های ریزآرایه مختلف، مجموعاً ۱۰۱ ژن (Up-regulated و Down-regulated) به دست آمد (شکل ۱). همچنین، با استفاده از این ۱۰۱ ژن دارای بالاترین و پایین‌ترین بیان در تحمل برنج به خشکی، شبکه ژنی براساس بیان، تنظیم و اتصال پرموتر بین ژن‌ها به وسیله نرم‌افزار Pathway Studio 9.0 ترسیم شد (شکل ۲). بیشترین تعداد ژن‌ها متعلق به گروه عوامل رونویسی^۳ می‌باشند.

4. Signal transduction

5. ABA-responsive elements (ABRE)

6. Protein Kinases

7. A MAP Kinase

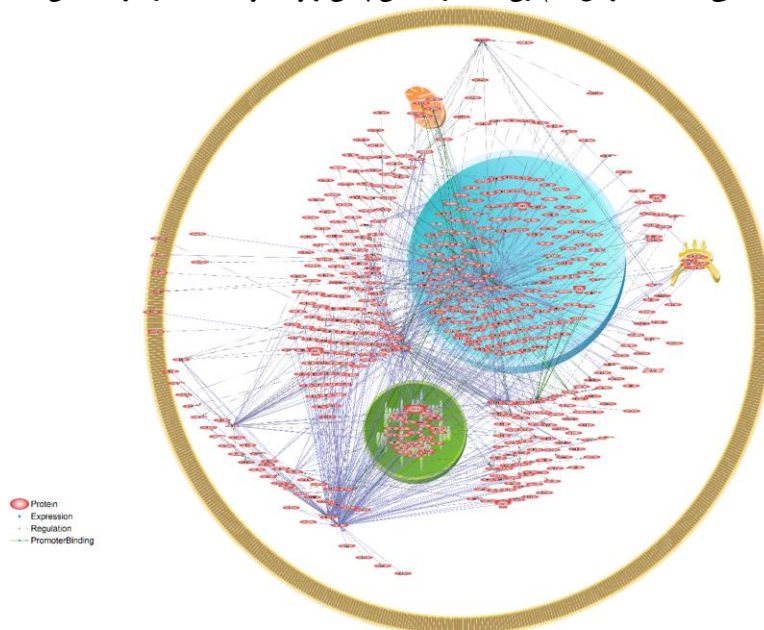
8. A MAP Kinase Kinase

۱ Gene Ontology (GO)

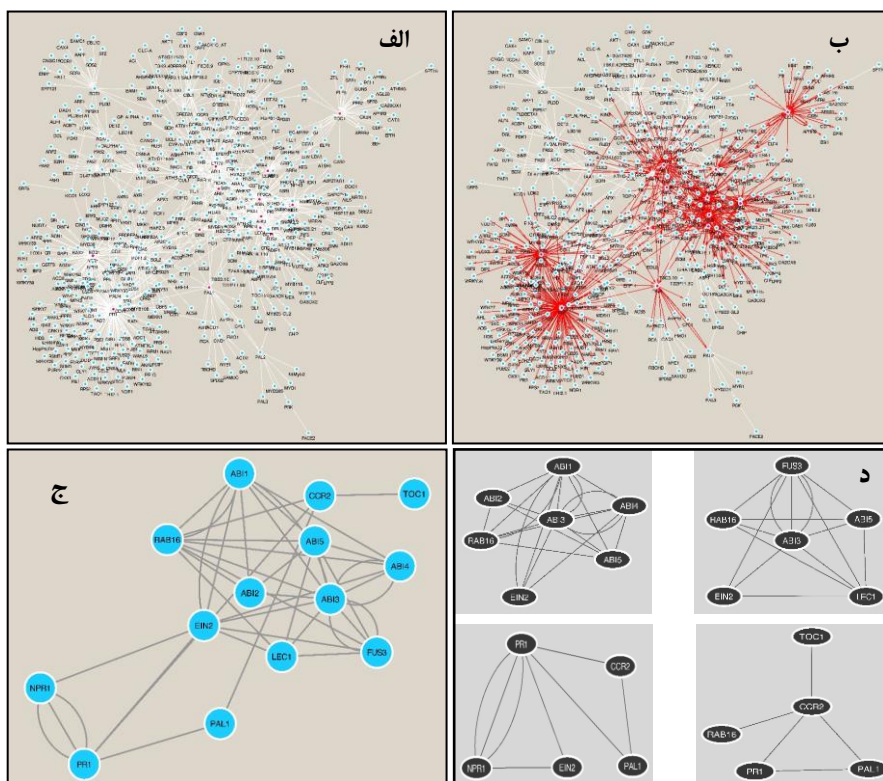
۲ Biological process

3. Transcription factors (TFs)

۲/۵ در شرایط تنش خشکی نسبت به نرمال. (ب) ژن‌های دارای بیان پایین‌تر و مساوی ۲/۵- در شرایط تنش خشکی نسبت به نرمال.

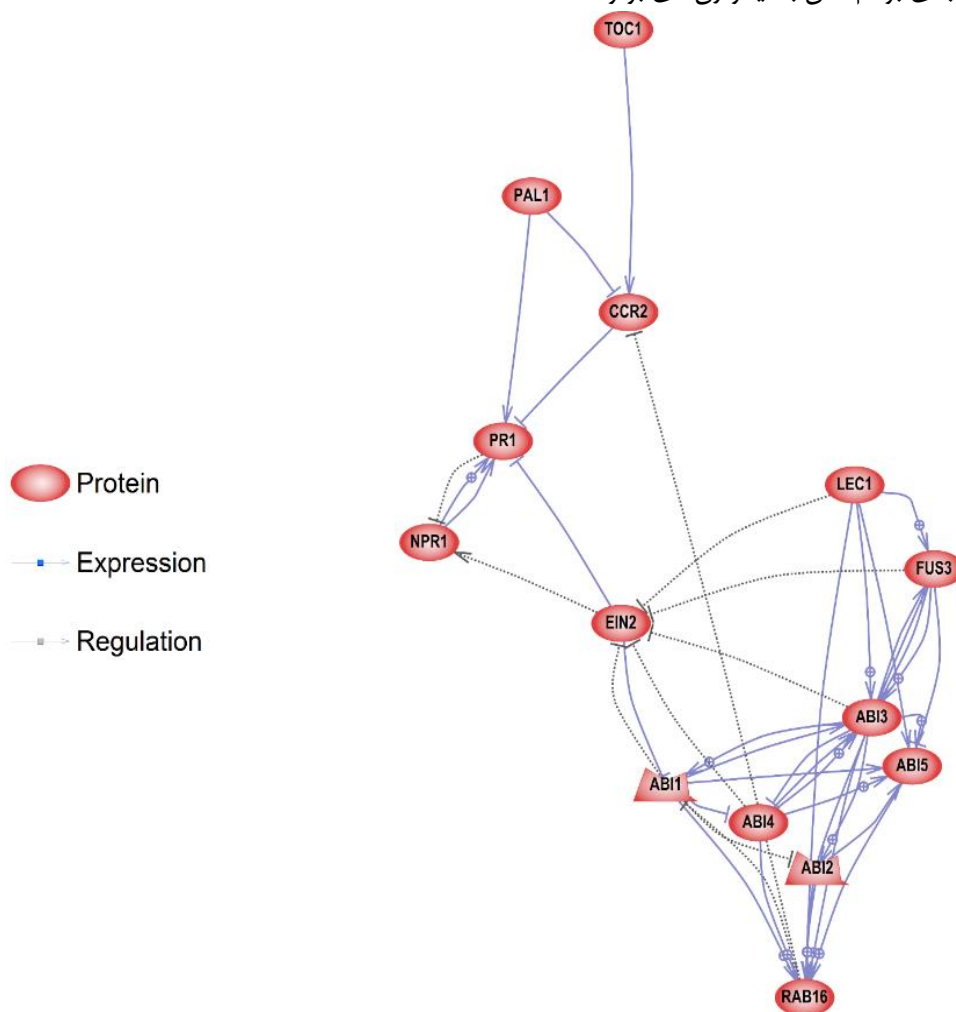


شکل ۲. شبکه ژنی روابط ۱۰۱ ژن و همسایه‌های شناخته شده در تحمل به تنش خشکی در برنج (ترسیم شده با استفاده از نرم افزار 9.0 Pathway Studio).



شکل ۳. شبکه ۹۰۴ برهم‌کنش پروتئینی از ۱۰۱ ژن شناسایی شده توسط Genevestigator (ترسیم شده با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape). (الف) گره‌های قرمز رنگ نشان دهنده ژن‌های دارای بیشترین برهم‌کنش، گره‌های آبی رنگ نشان دهنده باقی ژن‌های موجود در شبکه و خطوط سفید نیز نشان دهنده ارتباط مستقیم بین ژن‌ها در سطوح و لایه‌های مختلف می‌باشد. (ب) برهم‌کنش ۱۴ ژن برتر شناسایی شده با دیگر ژن‌ها که این ارتباطات به وسیله خطوط قرمز رنگ نشان داده شده است. (ج) برهم‌کنش ۱۴ ژن برتر شناسایی شده با یکدیگر. (د) ماژول‌های هر یک از چهار ژن اصلی *PR1*، *FUS3*، *ABI3* و *TOC1*

TOC1 بر مبنای برهم‌کنش با دیگر ژن‌های برتر.



شکل ۴. روابط مستقیم ۱۴ ژن دارای بیشترین برهم‌کنش بر اساس بیان و تنظیم مستقیم یکدیگر (ترسیم شده توسط نرم‌افزار Pathway Studio 9.0)

جدول ۲. ۱۴ ژن شناسایی شده با بیشترین برهم‌کنش در بین ۱۰۱ ژن شناسایی شده در Genevestigator با استفاده از

پلاگین Cyto-Hubba در نرم‌افزار Cytoscape

No.	Gene symbol	Gene name ¹	Orthologous in <i>Arabidopsis</i>	Uniprot ID
1	Os05g0537400	-	<i>ABI1</i>	Q6L5H6
2	Os01g0656200	-	<i>ABI2</i>	Q5SN75
3	Os01g0911700	<i>VP1</i>	<i>ABI3</i>	P37398
4	Os05g0351200	<i>ABI4</i>	<i>ABI4</i>	C7J2Z1
5	Os01g0859300	-	<i>ABI5</i>	Q0JHJ8
6	Os09g0127300	-	<i>CCR2</i>	Q6K3G8
7	Os07g0155600	-	<i>EIN2</i>	Q0D819
8	Os01g0713600	<i>LFL1</i>	<i>FUS3</i>	A4LBC0
9	Os06g0285200	<i>HAP3D</i>	<i>LEC1</i>	Q5VNF4
10	Os01g0194300	<i>NPR1</i>	<i>NPR1</i>	Q9FDY4
11	Os04g0518400	-	<i>PAL1</i>	Q7X8V3
12	Os04g0289500	-	<i>PR1</i>	Q0JED8
13	Os11g0453900	-	<i>RAB16</i>	Q2R4Z8
14	Os02g0618200	<i>PRR1</i>	<i>TOC1</i>	Q689G9

۱. عدم وجود نام ژن رایج برای ژن‌های دارای علامت (-) در برنج

جهت فعال‌سازی این ژن می‌باشد. همچنین *TOC1* به نوبه خود تنظیم‌کننده بیان ژن *MYB96* از طریق ژن *CCA1* می‌باشد. این سه ژن یک شبکه بازخورد^۵ جدید که پیوند دهنده واکنش‌های *ABA* با مکانیسم ساعت شبانه روزی است را تعریف می‌کنند. این حلقه نظارتی ارائه‌دهنده یک مکانیسم می‌باشد، که به موجب این مکانیسم زمان‌بندی برای حداکثر پاسخ‌دهی به *ABA* کنترل خواهد شد. این امر منجر به بهینه‌سازی ساختار گیاه می‌شود. در نتیجه یک ماژول تنظیمی پیچیده از *CCA1-MYB96-TOC1* هسته اصلی ارتباط بین مکانیسم ساعت شبانه روزی و پیام‌رسانی تنش به جهت بهینه‌سازی تناسب گیاه در شرایط تنش می‌باشد (Lee et al., 2016).

پروتئین‌کینازها و مکانیسم دفاع

از طرف دیگر، ژن *TOC1* بیان ژن *CCR2* که منجر به افزایش میزان تنظیم‌گردهای می‌شود را کنترل می‌کند (Osuna et al., 2007). همچنین ژن *CCR2* کنترل‌کننده بیان ژن *PRI* می‌باشد. ژن *PRI* به عنوان شاخصی در برابر مرگ سلول و القاکننده عملکرد دفاع به گیاه نقش ایفا می‌کند (LARA-NUÑEZ et al., 2006). از طرف دیگر *ROS*^۶ فعال‌کننده ژن‌های *MKK3* و *MPK7* می‌باشد. این دو ژن از مهم‌ترین پروتئین‌کینازها می‌باشند که به عنوان ماژول‌هایی برای بیان ژن *PRI* و در نتیجه القای عمل دفاعی در گیاه عمل می‌کنند (Dóczy et al., 2007). ژن *MKK3* از زیر خانواده *MAPKK* پس از انتقال درک پیام بر اثر زخمی شدن بافت گیاهی و هورمون اسید

ژن *TOC1* عامل اصلی در تنظیم *ABA* برای مکانیسم ساعت شبانه روزی

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود اولین بیان مستقیم توسط ژن *TOC1* انجام می‌شود. مکانیسم ساعت شبانه‌روزی^۱ یک مکانیسم حفاظت‌کننده زمان بیولوژیکی است، که تضمین‌کننده نوسان ریتمیک درونی با یک دوره تقریبی ۲۴ ساعته می‌باشد. یک موج متوالی از تنظیمات رونویسی در جهت منفی، تعریف‌کننده پایه ساختار ساعت شبانه‌روزی در آرابی‌دوپسیس می‌باشد. دو فاکتور رونویسی *CCA1* و *TOC1* به عنوان یک ماژول تنظیمی سرکوب‌کننده، سازنده هسته مرکزی ساعت شبانه‌روزی می‌باشند (Gendron et al., 2012; Huang et al., 2012; Schaffer et al., 1998; Strayer et al., 2000; Wang et al., 1998). مطالعات بسیاری در جهت ارتباط تنگاتنگ بین آبسزیک اسید^۲ (*ABA*) و پیام‌رسانی^۳ ساعت شبانه‌روزی صورت گرفته است. از این جمله می‌توان به برهم‌کنش دوجانبه بین *TOC1* و گیرنده‌های *ABA* به عنوان مبنای فرآیندهای تنظیم *ABA*، شامل: باز شدن روزنه و تحمل نسبت به تنش خشکی در گیاه اشاره نمود. همچنین ژن *PRR7* به عنوان جزئی از مکانیسم ساعت شبانه‌روزی، تنظیم‌کننده انبوهی از ژن‌های مرتبط با خشکی و *ABA* در یک مسیر وابسته به این مکانیسم می‌باشد (Correia et al., 1995; Fukushima et al., 2009; Legnaioli et al., 2009; Liu et al., 2013; Robertson et al., 2009). فاکتور رونویسی القاکننده *ABA* یا همان *MYB96* دارای اتصال به پیشران^۴ ژن *TOC1* در

1. Circadian clock

2. Abscisic acid

3. Signaling

4. Promoter

5. Feedback network

6. Reactive Oxygen Species (ROS)

تنظیم ژن *EIN2* می‌باشد.

هورمون گیاهی ABA نقش بسیار مهمی در کنترل دهانه روزنه برای کاهش تعرق را دارا می‌باشد. همچنین این هورمون قادر به القای ژن‌های دارای سازگاری با خشکی، در سراسر گونه‌های گیاهی می‌باشد (Danquah et al., 2014; Daszkowska-Golec et al., 2013). با استفاده از ژنومیکس شیمیایی^۴، یک ماده ترکیبی مصنوعی^۵ کوچک به نام سولفونامید پیرابکتین^۶ به‌عنوان یک واکنش‌دهنده قوی بین ژن *PYRI* و ABA شناسایی شده است. این امر منجر به شناسایی ۱۳ ژن دیگر مرتبط با *PYRI* شد (Park et al., 2009). هورمون ABA دارای اتصال با ژن *PYRI/RCAR1* می‌باشد. این ژن به‌عنوان مهارکننده پروتئین فسفاتاز نوع 2C (PP2C) که تنظیم‌کننده پاسخ‌دهی ABA در جهت منفی در آرآیدوپسیس می‌باشد، شناسایی شده است (Ma et al., 2009). زمانی که این پیوند با ABA برقرار شود، ژن *PYRI/RCAR1* و ۱۳ ژن مرتبط دیگر به صورت رقابتی، توانایی PP2C جهت دی‌فسفریلاسیون^۸ *SnRK2* را مهار می‌کنند. در نتیجه عمل پیام‌رسانی از مسیر وابسته به ABA فعال می‌شود (Cutler et al., 2010; Fujii et al., 2009). با افزایش تجمع ABA ناشی از کم‌آبی، ماژول PYR/RCAR-PP2C-SnRK2 باعث فعال شدن کانال‌های آنیونی^۹ سلول محافظ^{۱۰} می‌شود. این امر منجر به قطبش‌زدایی^{۱۱} غشا پلاسمایی^{۱۲} و در

جاسمونیک^۱ (JA) باعث بیان مستقیم ژن‌های *MPK1*، *MPK2* و *MPK7* از زیر خانواده MAPK می‌شود. این ژن‌ها نیز به همراه *MPK4* که بر اثر تنظیم ژن *MKK1* بیان می‌شود باعث پاسخ مستقیم گیاه به تنش‌های غیر زیستی و دفاع می‌شوند (Takahashi et al., 2009). به طور کلی ژن *PR1* در پاسخ به تنش خشکی، زخمی شدن بافت گیاه و همچنین در دفاع علیه حمله پاتوژن‌ها القاء می‌شود (Park et al., 2001).

همچنین، ژن *PR1* تنظیم‌کننده ژن *NPR1* می‌باشد. ژن *NPR1* به‌عنوان تنظیم‌کننده اصلی (مرکزی) اسید سالیسیلیک^۲ (SA) به‌عنوان واسطه در القای دفاع در آرآیدوپسیس عمل می‌کند (Sugano et al., 2010). بیان ژن *NPR1* در برنج با توسعه فنوتیپ LMD^۳ نشان‌دهنده نقش‌های چندگانه در پاسخ به تنش‌های گیاهی می‌باشد. با انتقال ژن *AtNPR1* از آرآیدوپسیس به برنج زمینه توسعه و کنترل فنوتیپ LMD که کنترل‌کننده مرگ سلول می‌باشد به همراه پاسخ‌دهی به دیگر تنش‌ها برای این گیاه فراهم گردید (Fitzgerald et al., 2004). از طرف دیگر ژن *NPR1* منجر به افزایش بیان ژن *PR1* می‌شود.

مکانیسم دفاعی از طریق مسیر وابسته به ABA
در سوی دیگر شبکه مذکور، دومین بیان مستقیم توسط ژن *LECI* صورت گرفته است (شکل ۴). ژن *LECI* فعال‌کننده رونویسی ژن‌های مسئول در بلوغ جنین می‌باشد. این ژن کنترل‌کننده مرحله گذار از دوران جنینی تا مرحله سبزی‌نگی در گیاه می‌باشد. این ژن منجر به افزایش بیان مستقیم ژن‌های *FUS3*، *ABI3*، *ABI5* و *RAB16* و همچنین کنترل‌کننده

4. Chemical genomics

5. Synthetic

6. Sulphonamide pyrabactin

7. Type 2C protein phosphatases (PP2C)

8. Dephosphorylate

9. Anion Channels

1 . Guard cell 0

1 . Depolarization 1

1 . Plasma membrane 2

1. Jasmonic Acid (JA)

2. Salicylic Acid (SA)

۳ Lesion-Mimic/Cell Death Phenotype

ABA به روشنی مشخص شده است (Park *et al.*, 2009). بررسی‌های فنوتایپیک قبلی نشان می‌دهند که عمدتاً *ABI1* و *ABI2* در مراحل رویشی گیاه عملکرد خود را بروز داده‌اند، در حالی که *ABI3* و *ABI4* در زمان رسیدگی دانه انجام فعالیت می‌کنند (Laby *et al.*, 2000). همچنین، محققان نشان داده‌اند که با القای ژن *abi1-1* در گیاهان تراریخته باعث القای خواب بذر در این گیاهان می‌شوند (Carrera *et al.*, 1998). در این تحقیق نشان داده شده است که بیان ژن *abi1-1* در گیاهان تراریخته منجر به توقف تجمع آر.ان.ای‌های پیام‌رسان (*TAS14* mRNA) و *LE25* بر اثر القای خشکی در پاسخ به ABA می‌شود. در نتیجه می‌توان بیان داشت که *ABI1* در مسیر درک از طریق ABA منجر به افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش خشکی شود. از طرف دیگر، *ABI3* و *ABI5* در مسیر وابسته به ABA به طور خاص، مسئول تنظیم رسیدگی بذر، جوانه زنی و رشد سریع جوانه‌ها می‌باشند (Pandey *et al.*, 2004).

مکانیسم دفاعی از طریق کنترل دوره نوری و زمان گل‌دهی

تا به امروز مشخص شده است که برنج تحت تأثیر عوامل بسیار متعدد محیطی از جمله دوره‌ی نوری، درجه حرارت، تغذیه و در دسترس بودن آب قرار دارد. دوره نوری زمان گل‌دهی، در حال حاضر مشخص شده است، و شاید به همین دلیل طول روز از دیگر عوامل محیطی مؤثر بر گیاه برنج در طول تغییرات فصلی قابل پیش‌بینی‌تر می‌باشد. برنج یک گیاه وابسته به تنوع در روز کوتاهی می‌باشد. به نحوی که گل‌دهی این گیاه در طول روزهای کوتاه نسبت به روزهای بلند سریع‌تر صورت می‌گیرد (Zhang *et al.*, 2008).

نتیجه بسته شدن روزنه‌ها می‌شود (Danquah *et al.*, 2014; Daszkowska-Golec; Szarejko 2013; Fujii *et al.*, 2009; Miyakawa *et al.*, 2013). همچنین این امر منجر به افزایش بیان ژن‌های دخیل در تحمل گیاه در زمان کم‌آبی می‌شود (Fujii; Zhu 2009; Fujita *et al.*, 2005). علاوه بر این نتایج تحقیقات گذشته نشان‌دهنده برهم‌کنش مستقیم بین *SnRK2.6/OST1* با *ABI1* بر اساس دُمین شماره II از ژن *SnRK2.6* در جهت بسته شدن روزنه‌ها نیز می‌باشند (Yoshida *et al.*, 2006).

اگرچه افزایش بیان گیرنده‌های ABA باعث بهبود تحمل گیاه به تنش خشکی می‌شود، اما این امر می‌تواند در شرایط بدون تنش منجر به عملکرد منفی محصول گردد (Cao *et al.*, 2013; Gonzalez-Guzman *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2013; Okamoto *et al.*, 2014). این نشان می‌دهد که با تنظیم دقیق فعالیت گیرنده‌های ABA به صورت فردی یا گروهی می‌توان میزان تحمل را با سطح تنش مورد نظر تطبیق داد. در نتیجه می‌توان بیان داشت که با بازمهندسی تنظیم گیرنده‌های ABA قادر خواهیم بود، سطح تحمل گیاه نسبت به تنش خشکی را افزایش دهیم. این دست‌ورزی ژنتیکی در درک القای ABA که همچنین در تحمل نسبت به تنش‌های غیرزیستی دیگری همچون سرما و شوری نیز مؤثر می‌باشد، می‌تواند فرصت‌های جدیدی را در حفاظت از گیاه فراهم نماید (Mickelbart *et al.*, 2015). از همین رو، عوامل رونویسی شناسایی شده در این پژوهش، از جمله: *ABI1/OsVP1* و *LEC1/OsHAP3D* از تنظیم‌کننده‌های کلیدی در این مسیر می‌باشند (Schallau *et al.*, 2008). در پژوهشی دیگر برهم‌کنش مستقیم بین *ABI1* و ۱۴ عضو خانواده ژنی PYR به طور مستقل شناسایی شده است. در این تحقیق نقش این برهم‌کنش‌ها در انتقال پیام

1. Messenger Ribonucleic Acid (mRNA)

2. Photoperiod

2016). در نتیجه با کنترل بیان ژن *Ehd1* توسط یکی از تنظیم‌کننده‌ها همچون ژن *LFL1* که در این پژوهش نیز شناسایی شد، می‌توان به نحوی زمان گل‌دهی گیاه برنج را تحت تأثیر قرار داد، که کمترین خسارت در شرایط تنش خشکی به گیاه وارد شود. تمامی این فعالیت‌ها که بر اثر برهم‌کنش مستقیم این ژن‌ها بر اساس بیان و تنظیم یکدیگر حاصل می‌شود اعم از کنترل مرگ سلول، انواع مقاومت‌ها و دفاع‌ها، تنظیم زمان بلوغ و رسیدگی جنین و بذر، کنترل مراحل رویشی، گل‌دهی و سبزیگی گیاه، کنترل روزنه‌ها و القای خواب در مراحل مختلف رشد گیاه منجر به افزایش مکانسیم تحمل گیاه نسبت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی به خصوص تنش خشکی می‌شود.

شبکه‌های هم‌بیانی ژنی

از طرف دیگر، بررسی شبکه‌های هم‌بیانی ژنی در کنار مطالعه شبکه‌های برهم‌کنش پروتئینی می‌تواند دید بازتری در جهت پی بردن به تصویری واضح‌تر نسبت به تنش‌های غیر زیستی در گیاهان را به محققان ارائه دهد. با بررسی این شبکه‌ها می‌توان به تعداد بسیار بیشتری از ژن‌هایی که با ژن‌های هدف مورد مطالعه این گونه تحقیقات، هم‌بیان و در مسیرهای بیولوژیکی مشابه قرار دارند پی برد. به دلیل چند ژنی بودن مکانسیم عمل تنش‌های غیر زیستی، هر چه میزان ژن‌های مورد بررسی به صورت هدفمند بیشتر باشد شناخت از مسیرها و فرآیندهای مولکولی، متابولیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی این ژن‌ها در مکانسیم تحمل به تنش‌های غیر زیستی همچون تنش خشکی بهتر و مؤثرتر خواهد بود. بر همین اساس، شبکه‌های هم‌بیانی ژنی به جهت شناسایی ژن‌های دارای همبستگی معنی‌دار در جهت مثبت با تمامی ژن‌های شناسایی‌شده به عنوان ژن‌های قطب (هاب) با استفاده از ابزار هم‌بیانی در Genevestigator بازسازی شدند (شکل ۵). به

al., 2016). ژن‌های *Hd3a* و *RFT1* به‌عنوان دو ژن پارالوگ^۱ در برنج عامل رمزگذاری مولکول‌های هورمون فلوریزین^۲ می‌باشند. در نتیجه انتقال این هورمون به مریستم انتهایی ساقه منجر به ترویج گل‌دهی در گیاه می‌شود (Komiya et al., 2008; Komiya et al., 2009; Tamaki et al., 2007; Tsuji et al., 2013). ژن‌های *HD1*، *DTH2* و *Ehd1* دو ژن *RFT1* و *Hd3a* را تنظیم می‌کنند. *HD1* به عنوان یک فعال‌کننده رونویسی برای *Hd3a* در روزکوتاهی و همچنین به عنوان یک مهارکننده در بروز عملکردی فیتوکروم^۳ B در روز بلندی برنج عمل می‌نماید (Hayama et al., 2011; Ishikawa et al., 2003). *DTH2* به عنوان سرکوب‌کننده گل‌دهی در روز بلندی عمل می‌کند (Wu et al., 2013). همچنین *Ehd1* رمزکننده یک عامل پاسخ‌دهنده مختص برنج از نوع B می‌باشد که منجر به ترویج بیان mRNA دو ژن *RTF1* و *Hd3a* در هر دو حالت روز کوتاهی و روز بلندی می‌شود (Doi et al., 2004; Komiya et al., 2009; Sun et al., 2014). بسیاری از ژن‌ها همچون *Ehd2*، *Ehd3*، *Ehd4*، *Ghd7*، *MADS51*، *PPR37* و *LFL1* سطح بیان و فعالیت ژن *Ehd1* را در هر دو مسیر وابسته و مستقل نسبت به طول روز تنظیم می‌کنند (Gao et al., 2014; Kwon et al., 2015; Tsuji et al., 2013; Yan et al., 2014). این‌گونه که به نظر می‌رسد *Ehd1* تحت تنظیم همگرا فعال‌کننده‌های روز کوتاهی، سرکوب‌کننده‌های روز بلندی و همچنین تنظیم‌کننده‌های مستقل از طول دوره نوری به جهت کنترل گل‌دهی برنج در پاسخ به توسعه داخلی و نشانه‌های محیطی قرار دارد (Zhang et al.,

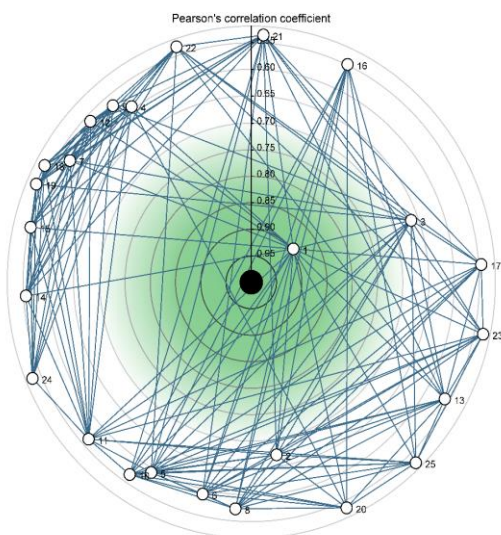
1. Paralog
2. Florigen
3. Phytochrome

جهت مثبت، نشان داده شده است.

عنوان مثال در شکل شماره پنج، ژن *LFL1* به عنوان یکی از ژن‌های دارای بیشترین برهم‌کنش و ژن هدف در این شبکه با ۲۵ ژن هم‌بیان دیگر آن در

Dataset: 672 perturbations (sample selection: OS-SAMPLES-0)

Target gene: Os01g0713600 (Os.8988.1.S1_at in gene selection OS-GENES-0)



Show only genes with correlation above: 0.530

Description of the most correlated genes (top 25)

Gene	Score	Description
01	0.90	Gene Symbol: LATE-FLOWERING 1; B3 domain-co...
02	0.67	Gene Symbol: HAP3 SUBUNIT E; MSU Locus: LOC...
03	0.66	MSU Locus: LOC_Os05g20954.2 cDNA retrotransp...
04	0.59	MSU Locus: LOC_Os04g47300.1 cDNA CAMK_CA...
05	0.59	MSU Locus: LOC_Os12g36490.1 cDNA expressed ...
06	0.59	MSU Locus: LOC_Os12g36490.1 cDNA expressed ...
07	0.58	MSU Locus: LOC_Os01g18360.1 cDNA OsIAA4 - A...
08	0.57	MSU Locus: LOC_Os11g41860.1 cDNA OsFBX429...
09	0.57	MSU Locus: LOC_Os01g18360.1 cDNA OsIAA4 - A...
10	0.57	MSU Locus: LOC_Os01g65240.1 cDNA retrospo...
11	0.56	MSU Locus: LOC_Os03g19550.1 cDNA retrotransp...
12	0.56	MSU Locus: LOC_Os01g18360.1 cDNA OsIAA4 - A...
13	0.56	MSU Locus: LOC_Os01g18360.1 cDNA expressed ...
14	0.56	MSU Locus: LOC_Os09g08910.1 cDNA ATP syntha...
15	0.55	DFCI OsGI: TC512676 UniRef100_Q2F951 Cluster...
16	0.55	MSU Locus: LOC_Os01g28744.1 cDNA retrotransp...
17	0.55	MSU Locus: LOC_Os05g30430.1 cDNA expressed ...
18	0.54	MSU Locus: LOC_Os09g08910.1 cDNA ATP syntha...
19	0.54	DFCI OsGI: TC563205 UniRef100_Q2F826 Cluster...
20	0.54	MSU Locus: LOC_Os07g05290.1 cDNA expressed ...
21	0.53	RAP: Os12i0584700-01 Os12g0584700 Similar to ...
22	0.53	MSU Locus: LOC_Os07g10120.1 cDNA expressed ...
23	0.53	MSU Locus: LOC_Os08g40010.1 cDNA expressed ...
24	0.53	MSU Locus: LOC_Os03g18530.1 cDNA EACGL1 - ...
25	0.53	RAP: Os12i0178800-01 Os12g0178800 Hypothetic...

شکل ۵. شبکه هم‌بیانی ژن *LFL1* به عنوان ژن هدف با ۲۵ ژن دیگر بر اساس میزان همبستگی پیرسون در محدوده ۰/۵ تا ۰/۹ (ترسیم شده توسط نرم‌افزار Geneinvestigator)

ژن‌های شناسایی شده به عنوان ژن‌های دارای بیشترین برهم‌کنش و ژن‌های برآمده از بازسازی شبکه‌های هم‌بیانی ژنی دارای گروه‌بندی تقریباً یکسان بودند (شکل ۶). به عنوان مثال تمام این ژن‌ها در تنظیم بیان دیگر ژن‌های مؤثر در تحمل نسبت به تنش خشکی، بیان یا عدم بیان ژن‌های دیگر و به طور مشخص در پاسخ به تنش‌ها نقش ایفا می‌نمایند.

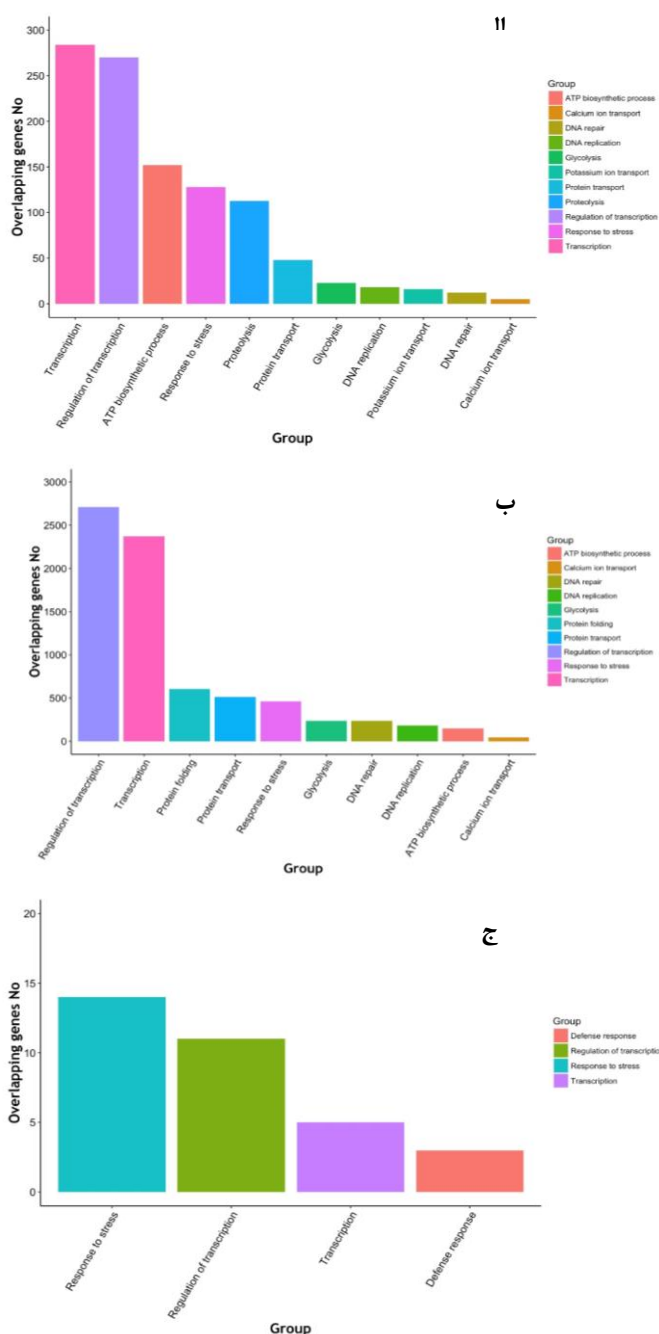
نتیجه‌گیری

با توجه به تحقیق انجام شده بر اساس روش‌های مختلف مورد استفاده جهت بازسازی شبکه‌های تنظیمی ژن همچون شبکه‌های برهم‌کنش پروتئینی و شبکه‌های هم‌بیانی ژنی، می‌توان پیشنهاد نمود که ۱۴ ژن شناسایی شده به عنوان ژن‌های قطب، هر کدام به تنهایی و همچنین با یکدیگر قادر به افزایش

زمانی که ژن‌های مورد بررسی در قالب فهرست‌های متعدد و یا از لحاظ تعداد مورد بررسی بسیار زیاد می‌باشند، بررسی و مطالعه تک تک ژن‌ها کاری سخت، پیچیده و طاقت فرسا می‌باشد. یکی از روش‌های تفسیر که در دهه اخیر به خصوص مورد توجه محققان قرار گرفته است، بررسی هستی‌شناسی تک تک ژن‌ها و گروه‌بندی نمودن سر دسته‌های اصلی جهت پی بردن به مهم‌ترین مسیرهای بیان و عملکرد مجموع این ژن‌ها می‌باشد. نرم‌افزار Pathway Studio 9.0 این امکان را فراهم می‌سازد تا پس از شناسایی ژن‌ها اطلاعات جانبی همچون هستی‌شناسی را برای ژن‌های شناسایی شده گروه بندی نموده و ارائه نماید. از همین رو، بر اساس نتایج به دست آمده از بررسی هستی‌شناسی هر سه گروه ژن مورد بررسی شامل تمامی ژن‌های به دست آمده از Geneinvestigator،

بر همین اساس، امید است تا با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش، با به وجود آوردن زمینه انتقال تعدادی از ژن‌های ذکر شده به برنج یا فراهم نمودن کنترل تنظیم بیان دیگر ژن‌ها از بین ۱۴ ژن مذکور از طریق ژن‌های بالا دستی به کنترل تنش پیچیده خشکی در این گیاه کمک شایانی نمود.

آستانه تحمل نسبت به تنش خشکی در گیاه برنج باشند. همچنین در بین این ۱۴ ژن می‌توان به نقش تأثیرگذار چهار ژن اصلی *ABI3*، *PR1*، *TOC1* و *FUS3* به ترتیب در تنظیم *ABA* و کنترل مکانیسم ساعت شبانه روز، مکانیسم دفاع، تحمل از مسیر وابسته به *ABA* و تنظیم زمان گل‌دهی اشاره نمود.



شکل ۶. بررسی هستی‌شناسی بر اساس فرآیندهای زیستی به دست آمده از نرم‌افزار Pathway Studio 9.0. (الف) هستی‌شناسی تمامی ژن‌های به دست آمده از Genevestigator. (ب) هستی‌شناسی تمامی ژن‌های شناسایی شده در تمام

شبکه‌های هم‌بیانی ژنی ۱۴ ژن برتر با استفاده از Genevestigator. (ج هستی‌شناسی ۱۴ ژن دارای بیشترین برهم‌کنش).

سپاسگزاری

این تحقیق در چهارچوب طرح مصوب شماره ۹۱۰۰۱۹۱۰۱-۰۵-۰۵-۱ پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به انجام رسیده است.

REFERENCES

- Ahmed HU, Henry A, Mauleon R, Dixit S, Vikram P, Tilatto R, Verulkar SB, Perraju P, Mandal NP, Variar M (2013) Genetic, physiological, and gene expression analyses reveal that multiple QTL enhance yield of rice mega-variety IR64 under drought. *PLoS One*(5): e62795.
- Cao M, Liu X, Zhang Y, Xue X, Zhou XE, Melcher K, Gao P, Wang F, Zeng LZ, Zhao Y (2013) An ABA-mimicking ligand that reduces water loss and promotes drought resistance in plants. *Cell Research*. 23 (8): 1043-1054.
- Carrera E, Prat S (1998) Expression of the *Arabidopsis* *sabi1-1* mutant allele inhibits proteinase inhibitor wound-induction in tomato. *The Plant Journal*. 15 (6): 765-771.
- Chin C-H, Chen S-H, Wu H-H, Ho C-W, Ko M-T, Lin C-Y (2014) cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Systems Biology*. 8 (4): 1.
- Correia M, Pereira J, Chaves M, Rodrigues MP, Pacheco C (1995) ABA xylem concentrations determine maximum daily leaf conductance of field-grown *Vitis vinifera* L. plants. *Plant, Cell & Environment*. 18 (5): 511-521.
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Reviews Plant Biology*. 61: 651-679.
- Danquah A, de Zelicourt A, Colcombet J, Hirt H (2014) The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology advances*. 32 (1): 40-52.
- Daszkowska-Golec AS, Zarejko I (2013) Open or close the gate—stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Frontiers in plant science*. 4 138.
- Degenkolbe T, Do PT, Zuther E, Reipsilber D, Walther D, Hincha DKK, Köhl KI (2009) Expression profiling of rice cultivars differing in their tolerance to long-term drought stress. *Plant molecular biology*. 69 (1-2): 133-153.
- Dóczi R, Brader G, Pettkó-Szandtner A, Rajh I, Djamei A, Pitzschke A, Teige MH, Hirt H (2007) The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *The Plant Cell Online*. 19 (10): 3266-3279.
- Doi K, Izawa T, Fuse T, Yamanouchi U, Kubo T, Shimatani Z, Yano MY, Yoshimura A (2004) Ehd1, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls FT-like gene expression independently of Hd1. *Genes & Development*. 18 (8): 926-936.
- Fell DA, Wagner A (2000) The small world of metabolism. *Nature Biotechnology*. 18 (11): 1121-1122.
- Fitzgerald HA, Chern M-S, Navarre RR, Ronald PC (2004) Overexpression of (*At*) NPR1 in rice leads to a BTH- and environment-induced lesion-mimic/cell death phenotype. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17 (2): 140-151.
- Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, Rubio S, Antoni R, Park S-Y, Cutler SR, Sheen J, Rodriguez PL, Zhu J-K (2009) In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature*. 462 (7273): 660.
- Fujii H, Zhu J-K (2009) *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-

- activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106 (20): 8380-8385.
- Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2005) AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 17 (12): 3470-3488.
- Fukushima A, Kusano M, Nakamichi N, Kobayashi M, Hayashi N, Sakakibara H, Mizuno T, Saito K (2009) Impact of clock-associated Arabidopsis pseudo-response regulators in metabolic coordination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(17): 7251-7256.
- Gao H, Jin M, Zheng X-M, Chen J, Yuan D, Xin Y, Wang M, Huang D, Zhang Z, Zhou K (2014) Days to heading 7, a major quantitative locus determining photoperiod sensitivity and regional adaptation in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111 (46): 16337-16342.
- Gendron JM, Pruneda-Paz JL, Doherty CJ, Gross AM, Kang SE, Kay SA (2012) Arabidopsis circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(8): 3167-3172.
- Gonzalez-Guzman M, Rodriguez L, Lorenzo-Orts L, Pons C, Sarrion-Perdigones A, Fernandez MA, Peirats-Llobet M, Forment J, Moreno-Alvero MC, Cutler SR (2014) Tomato PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors show high expression in root, differential sensitivity to the abscisic acid agonist quinabactin, and the capability to enhance plant drought resistance. *Journal of experimental botany*. 65 (15): 4451-4464.
- Hayama R, Yokoi S, Tamaki S, Yano M, Shimamoto K (2003) Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature*. 422 (6933): 719-722.
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in bioinformatics*. 2008
- Hu H, Xiong L (2014) Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. *Annual review of plant biology*. 65 715-741.
- Huang W, Pérez-García P, Pokhilko A, Millar A, Antoshechkin I, Riechmann JL, Mas P (2012) Mapping the core of the Arabidopsis circadian clock defines the network structure of the oscillator. *Science*. 336 (6077): 75-79.
- Ishikawa R, Aoki M, Kurotani K-i, Yokoi S, Shinomura T, Takano M, Shimamoto K (2011) Phytochrome B regulates Heading date 1 (Hd1)-mediated expression of rice florigen Hd3a and critical day length in rice. *Molecular Genetics and Genomics*. 285(6): 461-470.
- Jin X-F, Xiong A-S, Peng R-H, Liu J-G, Gao F, Chen J-M, Yao Q-H (2010) OsAREB1, an ABRE-binding protein responding to ABA and glucose, has multiple functions in Arabidopsis. *BMB reports*. 43 34-39.
- Kepes F, Guelzim N, Bottani S, Bourguin P (2002) Topological and causal structure of the yeast transcriptional regulatory network. *Nature Genetics*. 31 (1): 60-63.
- Kim H, Lee K, Hwang H, Bhatnagar N, Kim D-Y, Yoon IS, Byun M-O, Kim ST, Jung K-H, Kim B-G (2014) Overexpression of PYL5 in rice enhances drought tolerance, inhibits growth, and modulates gene expression. *Journal of experimental botany*. 65 (2): 453-464.

- Komiya R, Ikegami A, Tamaki S, Yokoi S, Shimamoto K (2008) Hd3a and RFT1 are essential for flowering in rice. *Development*. 135 (4): 767-774.
- Komiya R, Yokoi S, Shimamoto K (2009) A gene network for long-day flowering activates RFT1 encoding a mobile flowering signal in rice. *Development*. 136 (20): 3443-3450.
- Kwon C-T, Koo B-H, Kim D, Yoo S-C, Paek N-C (2015) Casein kinases I and 2 α phosphorylate *Oryza sativa* pseudo-response regulator 37 (OsPRR37) in photoperiodic flowering in rice. *Mol Cells*. 38 (1): 81-88.
- Laby RJ, Kincaid MS, Kim D, Gibson SI (2000) The *Arabidopsis* sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *The Plant Journal*. 23 (5): 587-596.
- Lara-nuñez A, Romero-romero T, Ventura JL, Blancas V, Anaya Alcrúz-ortega R (2006) Allelochemical stress causes inhibition of growth and oxidative damage in *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant, Cell & Environment*. 29 (11): 2009-2016.
- Lee HG, Mas P, Seo PJ (2016) MYB96 shapes the circadian gating of ABA signaling in *Arabidopsis*. *Scientific reports*. 6
- Legnaioli T, Cuevas JM, Mas P (2009) TOC1 functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought. *The EMBO Journal*. 28 (23): 3745-3757.
- Liu T, Carlsson J, Takeuchi T, Newton L, Farre EM (2013) Direct regulation of abiotic responses by the *Arabidopsis* circadian clock component PRR7. *The Plant Journal*. 76 (1): 101-114.
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E (2009) Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*. 324 (5930): 1064-1068.
- Maclean JL, Dawe D, Hettel GP (2002). *Rice almanac: Source book for the most important economic activity on earth*, CABI Publishing.
- Makumburage GB, Richbourg HL, LaTorre KD, Capps A, Chen C, Stapleton AE (2013) Genotype to phenotype maps: multiple input abiotic signals combine to produce growth effects via attenuating signaling interactions in maize. *G3: Genes| Genomes| Genetics*. 3 (12): 2195-2204.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 298 (5600): 1912-1934.
- Mickelbart MV, Hasegawa PM, Bailey-Serres J (2015) Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nature Reviews Genetics*. 16 (4): 237-251.
- Miyakawa T, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Tanokura M (2013) Structure and function of abscisic acid receptors. *Trends in plant science*. 18 (5): 259-266.
- Nikitin A, Egorov S, Daraselia NM, Mazo I (2003) Pathway studio the analysis and navigation of molecular networks. *Bioinformatics*. 19: 2155-2157.
- Obayashi T, Kinoshita K (2009) Rank of correlation coefficient as a comparable measure for biological significance of gene coexpression. *DNA Research*. 16 (5): 249-260.
- Okamoto M, Peterson FC, Defries A, Park S-Y, Endo A, Nambara E, Volkman B, Cutler SR (2013) Activation of dimeric ABA receptors elicits guard cell closure, ABA-regulated gene expression, and drought tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110 (29): 12132-12137.
- Osuna D, Usadel B, Morcuende R, Gibon Y, Bläsing OE, Höhne M, Günter M, Kamlage B, Trethewey R, Scheible WR

- (2007) Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*. 49 (3): 463-491.
- Ouzounis CAKarp PD (2000) Global properties of the metabolic map of *Escherichia coli*. *Genome Research*. 10 (4): 568-576.
- Pandey GK, Cheong YH, Kim K-N, Grant JJ, Li L, Hung W, D'Angelo C, Weinl S, Kudla JLuan S (2004) The calcium sensor calcineurin B-like 9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*. 16 (7): 1912-1924.
- Park JM, Park C-J, Lee S-B, Ham B-K, Shin RPaek K-H (2001) Overexpression of the tobacco Ts1l gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *The Plant Cell Online*. 13 (5): 1035-1046.
- Park S-Y, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues ATsz-fung FC (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *science*. 324 (5930): 1068-1071.
- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki KYamaguchi-Shinozaki K (2003) Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant physiology*. 133 (4): 1755-1767.
- Rabello A, Guimarães C, Rangel P, da Silva F, Seixas D, de Souza E, Brasileiro A, Spehar C, Ferreira MMehta Â (2008) Identification of drought-responsive genes in roots of upland rice (*Oryza sativa* L). *BMC genomics*. 9 (1): 485.
- Ravi K, Vadez V, Isobe S, Mir R, Guo Y, Nigam S, Gowda M, Radhakrishnan T, Bertioli DKnapp S (2011) Identification of several small main-effect QTLs and a large number of epistatic QTLs for drought tolerance related traits in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 122 (6): 1119-1132.
- Robertson FC, Skeffington AW, Gardner MJWebb AA (2009) Interactions between circadian and hormonal signalling in plants. *Plant Molecular Biology*. 69 (4): 419-427.
- Rohila JSYang Y (2007) Rice Mitogen-activated Protein Kinase Gene Family and Its Role in Biotic and Abiotic Stress Response. *Journal of Integrative Plant Biology*. 49 (6): 751-759.
- Sandhu N, Singh A, Dixit S, Cruz MTS, Maturan PC, Jain RKKumar A (2014) Identification and mapping of stable QTL with main and epistasis effect on rice grain yield under upland drought stress. *BMC Genetics*. 15 (1): 1.
- Schaffer R, Ramsay N, Samach A, Corden S, Putterill J, Carré IACoupland G (1998) The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis disrupts* circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell*. 93 (7): 1219-1229.
- Schallau A, Kakhovskaya I, Tewes A, Czihal A, Tiedemann J, Mohr M, Grosse I, Manteuffel RBäumlein H (2008) Phylogenetic footprints in fern spore-and seed-specific gene promoters. *The Plant Journal*. 53 (3): 414-424.
- Semagn K, Beyene Y, Warburton ML, Tarekegne A, Mugo S, Meisel B, Sehbiague PPrasanna BM (2013) Meta-analyses of QTL for grain yield and anthesis silking interval in 18 maize populations evaluated under water-stressed and well-watered environments. *BMC genomics*. 14 (1): 1.
- Shinozaki KYamaguchi-Shinozaki K

- (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of experimental botany*. 58 (2): 221-227.
- Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang P-L, Ideker T (2011) Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics*. 27 (3): 431-432.
- Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Raman R, Somers DE, Más P, Panda S, Kreps JAKay SA (2000) Cloning of the Arabidopsis clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science*. 289 (5480): 768-771.
- Sugano S, Jiang C-J, Miyazawa S-I, Masumoto C, Yazawa K, Hayashi N, Shimono M, Nakayama A, Miyao MTakatsuji H (2010) Role of OsNPR1 in rice defense program as revealed by genome-wide expression analysis. *Plant Molecular Biology*. 74 (6): 549-562.
- Sun C, Chen D, Fang J, Wang P, Deng XChu C (2014) Understanding the genetic and epigenetic architecture in complex network of rice flowering pathways. *Protein & Cell*. 5 (12): 889-898.
- Takahashi F, Ichimura K, Shinozaki KShirasu K (2009). Plant mitogen-activated protein kinase cascades in signaling crosstalk. Signal cross talk in plant stress responses. K. Yoshioka and K. Shinozaki. England, Wiley-Blackwell, Oxford. 136: 23-42.
- Tamaki S, Matsuo S, Wong HL, Yokoi SShimamoto K (2007) Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science*. 316 (5827): 1033-1036.
- Tardieu F (2011) Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought scenario. *Journal of Experimental Botany*. 269.
- Thieffry D, Huerta AM, Perez-Rueda ECollado-Vides J (1998) From specific gene regulation to genomic networks: a global analysis of transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Bioessays*. 20 (5): 433-440.
- Tran L-SPMochida K (2010) Functional genomics of soybean for improvement of productivity in adverse conditions. *Functional & integrative genomics*. 10 (4): 447-462.
- Tsuji H, Taoka K-iShimamoto K (2013) Florigen in rice: complex gene network for florigen transcription, florigen activation complex, and multiple functions. *Current Opinion In Plant Biology*. 16 (2): 228-235.
- Wang Z-YTobin EM (1998) Constitutive expression of the Circadian Clock Associated 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell*. 93(7): 1207-1217.
- Weber VS, Melchinger AE, Magorokosho C, Makumbi D, Bänziger MAtlin GN (2012) Efficiency of managed-stress screening of elite maize hybrids under drought and low nitrogen for yield under rainfed conditions in Southern Africa. *Crop Science*. 52 (3): 1011-1020.
- Wu W, Zheng X-M, Lu G, Zhong Z, Gao H, Chen L, Wu C, Wang H-J, Wang QZhou K (2013) Association of functional nucleotide polymorphisms at DTH2 with the northward expansion of rice cultivation in Asia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110 (8): 2775-2780.
- Xu J, Yuan Y, Xu Y, Zhang G, Guo X, Wu F, Wang Q, Rong T, Pan GCao M (2014) Identification of candidate genes for drought tolerance by whole-genome resequencing in maize. *BMC Plant Biology*. 14 (1): 1.
- Yan W, Liu H, Zhou X, Li Q, Zhang J, Lu L, Liu T, Liu H, Zhang CZhang Z (2014) Natural variation in Ghd7. 1 plays an important role in grain yield and adaptation in rice. *Cell Research*. 23 (7): 2969-2971.
- Yeger-Lotem E, Sattath S, Kashtan N, Itzkovitz S, Milo R, Pinter RY, Alon UMargalit H (2004) Network motifs in

- integrated cellular networks of transcription-regulation and protein-protein interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(16): 5934-5939.
- Yoshida R, Umezawa T, Mizoguchi T, Takahashi S, Takahashi F, Shinozaki K (2006) The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry.* 281 (8): 5310-5318.
- Zhang C, Liu J, Zhao T, Gomez A, Li C, Yu C, Li H, Lin J, Yang Y, Liu B, Lin C (2016) A Drought-Inducible transcription factor delays reproductive timing in rice. *Plant Physiol.* 171 (1): 334-343.
- Zhang Q (2007) Strategies for developing green super rice. *Proceedings of the national Academy of Sciences.* 104 (42): 16402-16409.
- Zheng J, Fu J, Gou M, Huai J, Liu Y, Jian M, Huang Q, Guo X, Dong Z, Wang H (2010) Genome-wide transcriptome analysis of two maize inbred lines under drought stress. *Plant Molecular Biology.* 72 (4-5): 407-421.