مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال نهم، شماره سوم، پیاپی بیست و نهم، بهار ۱۳۹۹ (۷۹-۶۷)

Crop Biotech.
Spring (2020) 9(3): 67-79. DOI: 10.30473/CB.2020.52899.1806

شناسایی و آنالیز پروموتر ژن‌های کلیدی دخیل در تحمل به تنش خشکی در مرحله زایشی جو با استفاده از آنالیز داده‌های ریزآرایه

سیده مهری جوادی[۱]، زهرا سادات شبر[۲*]، آسا ابراهیمی[۱]، مریم شهبازی[۳]

۱. گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. گروه پژوهشی زیست شناسی سیستم‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳. دانشیار فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۱۷ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/٤/۱۷)

Identification and promoter analysis of the key drought tolerance involved genes in reproductive stage in barley using microarray data analysis.

Seyede Mehri Javadi[1], Zahra-Sadat Shobbar[2*], Asa Ebrahimi[1], Maryam Shahbazi[3]

1. Department of Biotechnology and Plant Breeding, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
3. Associate Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

(Received: May 6, 2020 - Accepted: Jul. 7, 2020)

چکیده

خشکی مهم‌ترین تنش محیطی است که باعث کاهش عملکرد محصولات گیاهی می‌شود. تحقیقات در راستای ایجاد ارقام متحمل به تنش خشکی از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است. در این تحقیق تلاش شده است تا با آنالیز داده‌های تولید شده از طریق فناوری ریزآرایه، ژن‌های مهم پاسخگو به تنش خشکی و ژن‌های هاب در مرحله زایشی جو شناسایی‌شده و آنالیز پروموتور انجام گیرد. به همین منظور با استفاده از نرم‌افزار FlexArray تمامی ژن‌های دارای بیان افتراقی ۲/۵ ≤ و ۲/۵- ≥ در بین دو سری از آزمایشات ریزآرایه انجام شده در جو شناسایی شدند. نتیجه این تجزیه و تحلیل، شناسایی ۵۵۹ ژن پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در مرحله زایشی بود. ژن‌های هاب با استفاده از سه الگوریتم محاسباتی Cyto-Hubba در نرم‌افزار Cytoscape مشخص شدند. این امر منجر به شناسایی ۱۰ ژن غیر تکراری شد که به‌عنوان مؤثرترین ژن‌ها در پاسخ به تنش خشکی در نظر گرفته شدند. براساس بررسی هستی‌شناسی ژن‌های دارای بیان افتراقی و ژن‌های هاب، تنظیم رونویسی از گروه‌های اصلی بود که نشان دهنده اهمیت عوامل رونویسی در مکانیسم تحمل به خشکی می‌باشد. در میان عوامل رونویسی می‌توان به *HvCBF6*، *HvDRF1.3*، *LFL1* ، *VP1*، *WRKY71* و *ABI5* (متعلق به خانواده‌های AP2، WRKY و bZIP) اشاره کرد. آنالیز پرموتر نشان داد که برخی از خانواده‌های عوامل رونویسی از جمله AP2، AT-hook family، bHLH، NAC، bZIP و MYB قابلیت اتصال به ۸۵ درصد از پرموترهای شناسایی‌شده را دارند. مطالعه این عوامل رونویسی، می‌تواند به شناخت هر چه بیشتر سازوکار تحمل به تنش خشکی در جو کمک کند.

واژه‌های کلیدی: جو، تنش خشکی، ژن هاب، آنالیز پروموتر، هستی‌شناسی.

Abstract

Drought is the most important environmental stress that reduces crop yield. Therefore, research toward developing tolerant varieties is of great importance. In this study, microarray data analysis was used for identification of drought stress responsive genes and relevant hub genes in the reproductive stage of barley, and then their promoter analysis was performed. To achieve the goal, all the differentially expressed genes (DEGs) at drought conditions with fold changes ≥+2.5 and ≤-2.5 were identified between two microarray data-series in barley using FlexArray software. Bioinformatics analysis indicated that 559 genes were drought responsive at reproductive stage. The hub genes were distinguished using three Cyto-Hubba computational algorithms by Cytoscape software. Based on the hub analysis results, 10 unique (non-redundant) genes were identified as the most effective genes in response to drought stress. According to the gene ontology analysis of DEGs and hub genes, regulation of transcription were among the major groups indicating the importance of transcription factors (TFs) at drought tolerance mechanism. Amongst the hubs, several TFs such as *HvCBF6*, *HvDRF1.3*, *LFL1*, *VP1*, *ABI5* and *WRKY71* genes (belonged to AP2, WRKY and bZIP families) were observed. Promoter analysis was also revealed that some TF families including AP2, AT-hook family, bHLH, NAC, bZIP and MYB had binding site in 85% of promoters of the drought responsive genes and the hub genes in barley. Studying these transcription factors can help in better identification of drought tolerance mechanism in barley.

Keywords: Barley *(Hordeum vulgare*), drought stress, hub gene, gene ontology, promoter analysis

* نویسنده مسئول: زهرا سادات شبر
E-mail: shobbar@abrii.ac.ir

مقدمه

یکی از تأثیرگذارترین عوامل محدودکننده محیطی بر عملکرد تولیدات گیاهی تنش‌های غیر زیستی و مهم‌ترین آن‌ها کمبود منابع آبی و وجود تنش خشکی می‌باشد (Alghabari and Ihsan, 2018; Zhang et al., 2018). تغییرات آب وهوایی که در سراسر جهان رخ داده است، باعث شده است که میزان بارش سالانه کاهش و دمای بیشتر مناطق افزایش یابد. با توجه به اهمیت مسئله، از مهم‌ترین اولویت‌ها، افزایش سطح تحمل به تنش خشکی در گیاهان می‌باشد. در این راستا درک مکانیسم پاسخ گیاهان متحملی همچون جو به تنش خشکی می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در جهت بالا بردن سطح تحمل به تنش خشکی و اصلاح گیاهان در اختیار بگذارد (Mir *et al*., 2012).

بخش اعظمی از کشور ایران نیز در نواحی خشک و نیمه خشک قرار گرفته است و به همین دلیل زراعت جو در کشور مورد توجه می‌باشد (Amini , 2013). در ایران از لحاظ سطح زیر کشت، جو بعد از گندم در رتبه دوم قرار دارد. براساس آمار منتشره در سال ۲۰۱۴ در جهان حدود ۱۴۵/۳ میلیون تن جو، از حدود ۴۹/۶۶ میلیون هکتار و در ایران نیز بیش از ۲/۸ میلیون تن از حدود ۱/۶۴ میلیون هکتار زمین کشاورزی در همین سال برداشت شده است (FAO, 2014). اما هر ساله خسارت زیادی به‌خاطر خشکسالی به تولید این محصول وارد می‌شود، به‌عنوان مثال در سال ۲۰۰۱ کاهش تولید گندم و جو بر اثر خشکسالی در ایران ۷۵-۳۵ درصد تخمین زده شد (Agrawala *et al*., 2001). تحمل به خشکی یک صفت کلیدی برای افزایش و پایداری تولید جو در نواحی خشک در سطح جهان می‌باشد (Guo *et al*., 2009).

جو (*Hordeum vulgare* L.) در مقایسه با سایر غلات بیشترین مقاومت را به تنش خشکی نشان می‌دهد و دارای سازوکارهای کارآمدتری در برابر کمبود آب می‌باشد (Ahmed et al., 2013). به‌دلیل انجام طیف گسترده‌ای از مطالعات فیزیولوژیکی، مرفولوژیکی و همچنین تنوع زیاد ژنومی، این گیاه به‌عنوان گیاه مدل مناسب برای تنش‌های غیرزیستی انتخاب شده است (Hackenberg et al., 2015). مطالعه بر روی سازوکارهای تحمل تنش خشکی در گیاهان می‌تواند در درک بهتر اساس ژنتیکی به خشکی مفید واقع شود، بدین منظور یکی از کارآمدترین فناوری‌ها در عصر حاضر فناوری‌های امیکس می‌باشد. فناوری مذکور با روشن نمودن نحوه فعالیت ژنوم در یک شرایط تکاملی یا محیطی خاص با ایجاد تصویری جامع و روشن از نحوه پاسخ گیاه به تنش، راه را برای دست‌ورزی ژنتیکی و مهندسی گیاهان، در راستای تحمل به تنش، هموارتر می‌سازند (Arriagada et al., 2017).

جهت شناسایی ژن‌های مسئول در ایجاد تحمل به تنش خشکی در جو مطالعات گسترده‌ای صورت گرفته است و ژن‌های بسیاری در این زمینه شناسایی و معرفی شده‌اند (Ozturk *et al*., 2002; Talamè *et al*., 2006; Guo *et al*., 2009; Abebe *et al*., 2010; Worch *et al*., 2011; Hübner *et al*., 2015; Liang *et al*., 2017; Janiak *et al*., 2018). ازآنجا که صفت تحمل به تنش خشکی پلی‌ژنیک است، با وجود تمام مطالعاتی که در سال‌های اخیر در ارتباط با سازوکار سلولی و مولکولی پاسخ به تنش خشکی انجام شد و اطلاعات ارزشمندی را ایجاد کرد، ولی هنوز درک درستی از سازوکار تنظیمی تحمل به تنش خشکی و حفظ رشد گیاه تحت تنش خشکی وجود ندارد و می‌طلبد که در این رابطه تحقیقات کامل‌تری صورت پذیرد. جهت شناسایی ژن‌های مسئول در ایجاد تحمل به تنش خشکی، شایسته است که با جمع‌آوری تمامی ژن‌های معرفی‌شده تاکنون مطالعه جامعی بر روی ژن‌هایی که تغییر بیان قابل ملاحظه‌ای تحت تنش

خشکی نسبت به شرایط نرمال دارند، انجام گیرد تا دید جامعی نسبت به عملکرد مجموع این ژن‌ها در ایجاد تحمل به تنش خشکی ارائه گردد. بر همین اساس در این پژوهش سعی شده است در گام نخست با استفاده از تجزیه و تحلیل داده‌های ریزآرایه، ژن‌های مؤثر دخیل در این تنش در مرحله زایشی گردآوری گردند. سپس ژن‌هایی با بیشترین ارتباط (ژن‌های هاب) در سطح سلول شناسایی شوند و عملکرد و ویژگی آنان مشخص شود و در نهایت آنالیز عناصر تنظیمی حفاظت شده از جمله پرموترها (Freeling *et al.*, 2009) در توالی ژن‌های شناسایی‌شده و در توالی ژن‌های هاب به عمل آید. تا در نهایت بتوان، با انجام مجموعه این بررسی‌ها در این پژوهش، به دید روشن‌تری نسبت به عملکرد مکانیسم پیچیده تحمل جو نسبت به تنش خشکی دست یافت.

مواد و روش‌ها

مشخصات داده‌های ریزآرایه مورد بررسی

در این پژوهش، دو سری داده ریزآرایه جو موجود در NCBI از پایگاه داده GEO[1] (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) با شماره‌های دسترسی GSE15970 و GSE17669 دانلود شدند و مورد بررسی قرار گرفتند. آزمایش GSE15970 بررسی تغییرات بیان ژنی تحت یک روز، سه روز و پنج روز تنش خشکی در نمونه‌های برگ پرچم در دو رقم متحمل Martin و Hordeum spontaneum 41-1 (HS41-1) و رقم حساس Moroc9-75 با سه تکرار زیستی و در آزمایش GSE17669 بررسی تغییرات بیان ژنی در نمونه‌های سنبله در رقم Morex تحت ۴ روز تنش خشکی در مرحله پر شدن دانه با سه تکرار زیستی بررسی شدند.

1. Gene Expression Omnibus

در هر دو آزمایش از تکنولوژی Affymetrix استفاده شد و فرمت داده‌های دریافتی CEL می‌باشد.

نحوه شناسایی ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی

نرمال‌سازی داده‌های دو سری داده آزمایش ریزآرایه توسط الگوریتم RMA با استفاده از نرم‌افزار Expression console (Ver.1.3.1) (http://www.affymetrix.com/products/software/compatible/index.affx) صورت گرفت. در نهایت ژن‌های با بیان افتراقی ≤۲/۵ و ≥۲/۵- و p-value ≤۰/۰۵ توسط نرم‌افزار FlexArray Ver.1.6.3 (http://www.affymetrix.com/products/software/compatible/index.affx) در حالت تنش خشکی نسبت به شرایط نرمال در جو براساس اندام زایشی، شناسایی شدند.

تعیین ژن‌های هاب در پاسخ به تنش خشکی

با توجه به این‌که مرحله زایشی در جو مرحله حساس و مهمی در عملکرد جو محسوب می‌شود، آنالیز هاب بر روی ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در مرحله زایشی انجام شد. اما از آنجایی‌که در نرم‌افزارهایی همچون (http://string-db.org) STRING Ver.10 که به‌منظور رسم شبکه ژنی و نیز فراهم نمودن برهم‌کنش‌های پروتئینی در دسترس هستند (Szklarczyk et al., 2014)، اطلاعات مربوط به جو بسیار ناقص است، بازسازی شبکه ژنی/ پروتئینی مربوطه امکانپذیر نمی‌باشد. بنابراین به سبب قرابت بالا، از ژن‌های برنج به‌عنوان مدل استفاده شد. به این منظور اورتولوگ ژن‌های دارای بیان افتراقی در اندام‌های زایشی جو از طریق ابزارهای (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov)

BLASTx و BLASTn در برنج شناسایی شد (Altschul *et al*., 1990; Altschul *et al*., 1997). به‌منظور رسم شبکه ژنی از طریق نرم‌افزار STRING Ver.10 پس از جستجوی تمامی ژن‌ها توسط نرم‌افزار، همسایه‌های آن‌ها نیز به‌دست آمد و براساس ژن‌های اصلی و همسایه‌ها، شبکه ژنی بین آن‌ها در سلول بازسازی و ترسیم شد. فهرست برهم‌کنش پروتئینی توسط نرم‌افزار STRING Ver.10 تهیه شد. در مرحله‌ی بعد برای رسم شبکه برهم‌کنش پروتئینی و شناسایی ژن‌های مؤثر در این شبکه از نرم‌افزار Cytoscape Ver. 3.5 و پلاگین Cyto-Hubba آن استفاده شد (Smoot *et al*., 2011). لازم به ذکر می‌باشد که جهت شناسایی ژن‌های هاب (۱۰ گره با بیشترین برهم‌کنش) در شبکه از سه الگوریتم محاسباتی Cyto-Hubba به نام‌های Degree، Closeness و MNC[1] استفاده شد.

تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی (GO)[2]

آنالیز هستی‌شناسی ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در اندام‌های زایشی با استفاده از نرم‌افزار تحت وب AgriGO (http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO) انجام شد (Tian *et al*., 2017). جهت شناسایی گروه‌های عملکردی ژن‌های دارای بیان افتراقی از روش SEA استفاده شد. همین طور جهت محاسبه p-value و adjusted p-value به‌ترتیب از Fisher exact test و FDR[3] استفاده شد. تمام ژن‌های مورد بررسی براساس فرایندهای زیستی، اجزای سلولی و عملکرد مولکولی گروه‌بندی و تجزیه و تحلیل شدند.

آنالیز پروموتر

توالی پروموتری اورتولوگ‌های ژن‌های شناسایی‌شده دارای بیان افتراقی در برنج، در بسته نرم‌افزاری Genomatix (https://www.genomatix.de) و با استفاده از نرم‌افزار Gene2Promoter استخراج گردید (Cartharius *et al*., 2005). شایان ذکر است نواحی پروموتری همه ژن‌ها به‌صورت ۱۰۰۰ جفت باز بالادست و ۲۰۰ جفت باز پایین دست از محل آغاز رونویسی ژن مورد نظر تعریف و استخراج شد. در این بررسی، چون هدف اصلی شناسایی عوامل رونویسی کلیدی بود، به‌منظور تشخیص خانواده عوامل رونویسی شایع و ماژول‌های شایع که در ۸۵ درصد از پروموترها وجود دارند با ($p\text{-value}\leq 0.05$) به‌ترتیب از آنالیزهای Common TFs و Frameworker استفاده شد. در آنالیز انجام شده میزان شباهت هسته مرکزی[4] عدد ۱ در نظر گرفته شد و میزان ماتریس شباهت[5] نیز بر روی گزینه Optimized تنظیم شد.

دسته‌بندی ژن‌ها

برای دسته‌بندی و مقایسه فهرست ژن‌های شناسایی‌شده دخیل در تنش خشکی توسط روش‌های ذکرشده از نرم‌افزار تحت وب Venny (https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny) استفاده شد.

نتایج و بحث

شناسایی ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی و تعیین هستی‌شناسی در مرحله زایشی جو

با آنالیز دو سری از داده‌های ریزآرایه و پس از حذف ژن‌های تکراری به دست آمده از نمونه‌های متفاوت تنش خشکی در مجموع ۵۵۹ ژن دارای بیان افتراقی در مرحله زایشی شناسایی شد که ۲۹۵ ژن بیان

1. Maximum Neighborhood Component
2. Gene Ontology (GO)
3. False discovery rate

4.Core similarity
5. Matrix similarity

بالاتر و مساوی ۲/۵ و ۲۶۴ ژن بیان پایین‌تر و مساوی ۲/۵- داشتند. آنالیز هستی‌شناسی مربوط به ژن‌هایی که دارای بیان بالاتر و مساوی ۲/۵ بودند، نشان داد که در بخش فرایندهای زیستی گروه‌های مهمی همچون تنظیم فرایندهای زیستی[1] (8.1e-05)، تولید مثل[2] (0.033) و فرایندهای زایشی[3] (0.029) دارای فراوانی معنی‌دار بودند. وجود فراوانی معنی‌دار برای ژن‌هایی که تنظیم فرایندهای زیستی را بر عهده دارند به وجود عوامل رونویسی و نقش آنها در پاسخ به تنش خشکی مربوط می‌شود (Singh *et al* 2010). در بخش اجزای سلولی، سلول (1.93e-12) و کمپلکس ماکرومولکول‌ها (0.029) دارای فراوانی معنی‌دار بودند. از میان گروه‌های مهم غنی‌شده در بخش عملکرد مولکولی می‌توان به فعالیت کاتالیتیکی (0.0043)، اتصال (0.021)، فعالیت تنظیم آنزیمی (0.012)، فعالیت تنظیم رونویسی (0.04) و فعالیت انتقال (0.0095) اشاره نمود (شکل ۱). در بررسی‌های انجام‌شده در جو تحت تنش خشکی، گروه‌های هستی‌شناسی ذکرشده، جزو مهمترین گروه‌ها در بخش‌های فرایندهای زیستی، اجزای سلولی و عملکردهای مولکولی معرفی شده‌اند (Janiak *et al*., 2018).

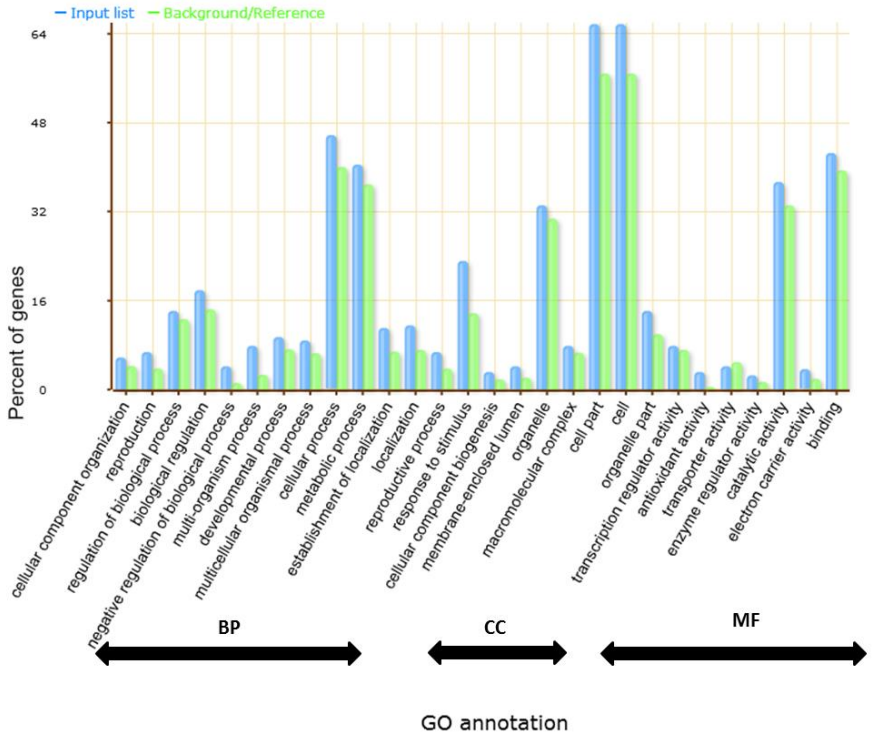
همچنین آنالیز هستی‌شناسی ژن‌هایی که دارای بیان افتراقی پایین و مساوی ۲/۵- داشتند در بخش فرایندهای زیستی فرایند فتوسنتز (4.4e-05)، فرایند تثبیت کربن (6.2e-07) دارای فراوانی معنی‌دار بودند. در بخش اجزا سلولی کلروپلاست (4.4e-05) کمپلکس کربوکسیلازی ریبولوز بیس فسفات (9.3e-08)، وزیکول‌های کلروپلاستی (0.0018)، دارای فراوانی معنی‌دار بودند. در بخش عملکرد مولکولی می‌توان به فعالیت کاتالیتیکی (3.7e-8)، فعالیت اکسیدرودوکتاز (2e-08)، فعالیت کربوکسیلازی ریبولوز بیس فسفات (9.3e-08)، فعالیت ترانسفرازی (6.7e-05) و فعالیت اتصال یون فلزی (0.00019) اشاره نمود (شکل ۲). فتوسنتز جزو اولین فرایندهای است که تحت تأثیر تنش خشکی قرار می‌گیرد یکی از عواملی که باعث کاهش فتوسنتز می‌شود کاهش عملکردی آنزیم ریبولوز ۵، ۱ بیس فسفات است، در اثر تنش خشکی، فعالیت کربوکسیلازی آن کاهش می‌یابد و موجب کاهش عملکرد چرخه کالوین می‌شود (Zlatev, 2012). در این پژوهش ژن‌های دخیل در چرخه تثبیت کربن در فتوسنتز مانند ژن مربوط آنزیم روبیسکو و کمپلکس پروتئینی جذب‌کننده نور[4] chl a/b کاهش بیان را نشان دادند. این نتایج با یافته‌های گزارش شده توسط (Ozturk *et al*., 2002; Talame *et al*., 2007) در جو هماهنگ می‌باشد.

تعیین ژن‌های هاب در پاسخ به تنش خشکی

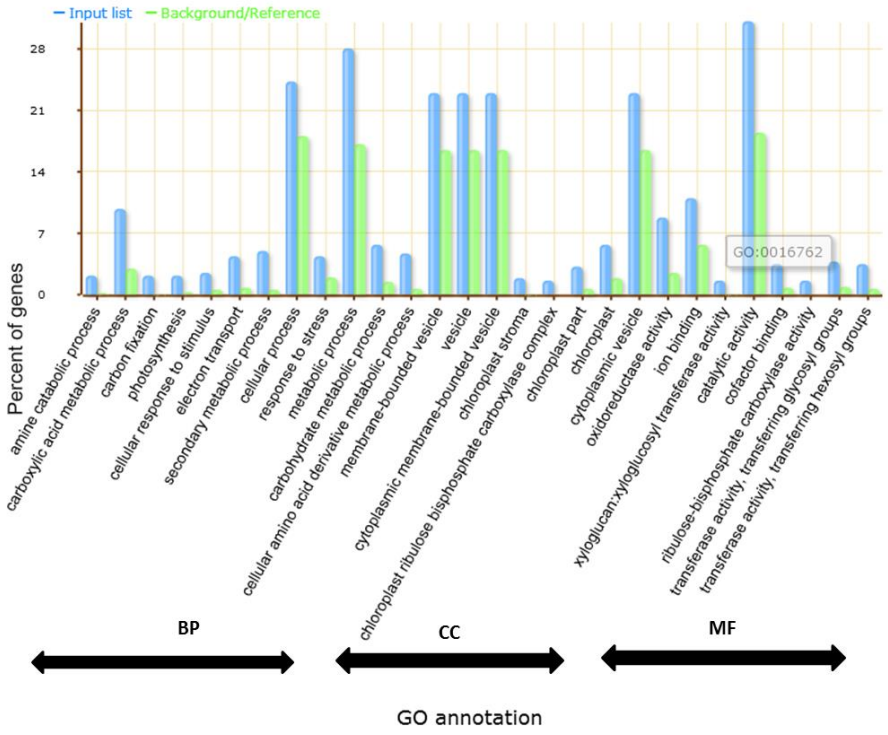
تنش خشکی در تمام اندام‌ها و مراحل نموی گیاه تأثیر می‌گذارد ولی مرحله نموی زایشی به‌دلیل این‌که عملکرد دانه را در جو تعیین می‌نماید مرحله حساسی می‌باشد (Abebe *et al*., 2010; Guo *et al*., 2009). آنالیز تعیین ژن‌های هاب بر روی کل ژن‌های شناسایی‌شده دارای بیان افتراقی انجام شد. فهرست برهم‌کنش‌های پروتئینی به‌دست آمده این ژن‌ها توسط نرم‌افزار STRING ver.10 وارد نرم‌افزار Cytoscape ver. 3.5 شد و با استفاده از سه الگوریتم Cytohubba Plug-in، ژن‌های هاب برای فهرست برهم‌کنش‌های پروتئینی به دست آمد، که در شکل۳ برهمکنش پروتئینی ژن‌های هاب قابل مشاهده می‌باشد و مشخصات آنها به تفکیک در جدول ۱ آمده است.

1. Regulation of biological process
2. Reproduction
3. Reproductive process

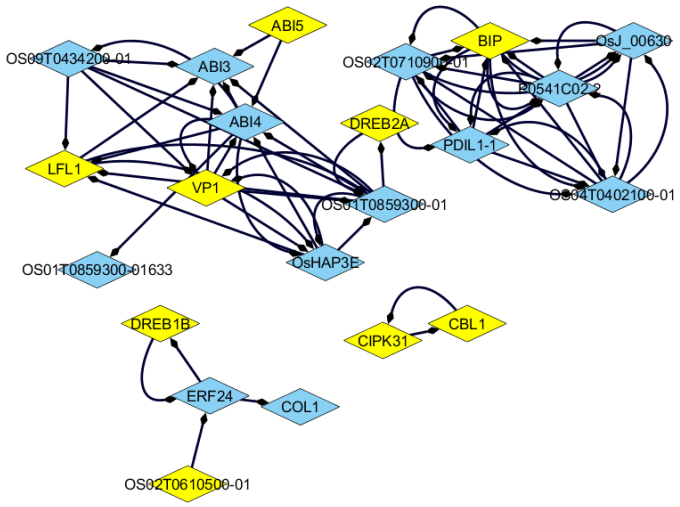
1. Chlorophyll a/b-binding protein



شکل ۱. بررسی هستی‌شناسی (فرایندهای زیستی(BP)، اجزای سلولی (CC)، عملکردهای مولکولی (MF)) ژن‌های شناسایی‌شده دارای بیان افتراقی بالاتر و مساوی ۲/۵ در اندام‌های زایشی جو توسط نرم‌افزار تحت وب AgriGo.



شکل ۲. بررسی هستی‌شناسی فرایندهای زیستی (BP)، اجزای سلولی (CC)، عملکردهای مولکولی (MF)) ژن‌های شناسایی‌شده دارای بیان افتراقی پایین‌تر و مساوی ۲/۵ در اندام‌های زایشی جو توسط نرم‌افزار تحت وب AgriGo.



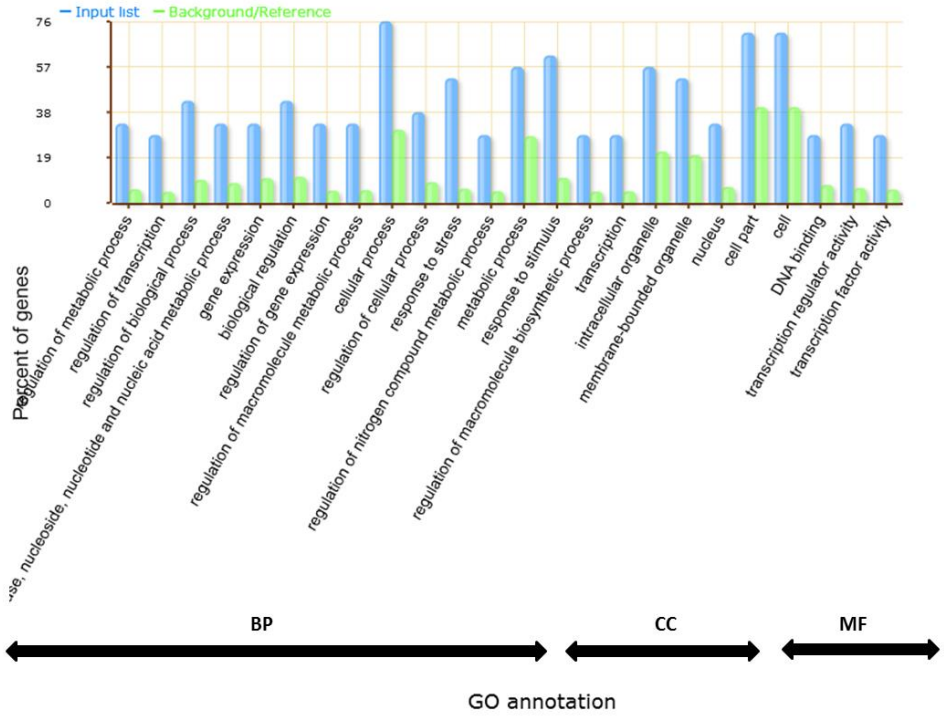
شکل ۳. شبکه برهمکنش پروتئین- پروتئین برای ژن‌های هاب دخیل در تنش خشکی در اندام‌های زایشی جو (ژن‌های هاب مربوطه با رنگ زرد مشخص شده‌اند) ترسیم شده با استفاده از نرم‌افزارCytoscape.

جدول ۱- ۱۰ژن هاب شناسایی‌شده در مرحله زایشی جو تحت تنش خشکی

ردیف	نام ژن در برنج	نام ژن در جو	کد شناسایی در Uniprot Rice	کد شناسایی در Uniprot Barley	دسته عملکردی ژن	مکان سلولی ژن	میزان نسبی بیان ژن براساس داده‌های ریزآرایه	الگوریتم انتخاب‌کننده
۱	BIP1	-	Q6Z7B0_ORYSJ	F2CS54_HORVV	چاپرون	شبکه آندوپلاسمی	۲,۶۲۸۹۹۶	MNC, Degree, Closeness
۲	DREB1A	HvCBF6	DRE1A_ORYSJ	B8PZJ5_HORVV	فاکتور رونویسی	هسته	۲,۸۹۸۱۳۲	MNC
۳	DREB2A	HvDRF1.3	DRE2A_ORYSJ	Q4ZGK0_HORVV	فاکتور رونویسی	هسته	۲,۹۶۱۱۵۳	Degree
۴	CIPK31		CIPKV_ORYSJ	F2DYC9_HORVV	کیناز	هسته	-۲,۷۹۷۹۴۵	Closeness/MNC
۵	VP1	-	VIV_ORYSJ	F2EI20_HORVV	فاکتور رونویسی	هسته	۳,۱۸۳۶۰۹	Closeness/MNC
۶	WRKY71	-	WRK71_ORYSI	F2D8Q7_HORVV	فاکتور رونویسی	هسته	۲,۶۷۹۲۱	Closeness
۷	CBL1		CNBL2_ORYSJ	F2CUW0_HORVV	اتصال دهنده یون کلسیم	واکوئل	۳,۰۵۶۲۱۵	Closeness
۸	Os02g0610500		Q6K9C5_ORYSJ	F2DY41_HORVV	فاکتور رونویسی	هسته	۲,۶۸۲۱۱۴	MNC
۹	Putative Bzip(TF) ABI5	-	Q67TQ5_ORYSJ	F2E5C7_HORVV	فاکتور رونویسی	هسته	۲,۷۷۶۸۴۶	Degree, Closeness
۱۰	LFL1		LFL1_ORYSJ	F2EG65_HORVV	فاکتور رونویسی	هسته	۵,۵۴۷۱۶۹	Closeness

آنالیز هستی‌شناسی مربوط به ژن‌های هاب مشخص کرد که در بخش فرایندهای زیستی گروه‌های مهمی همچون فرایندهای بیان ژن (0.0043) و تنظیم بیان ژن (7.1e-05)، تنظیم رونویسی (0.00035) دارای فراوانی معنی‌دار بودند. در بخش اجزای سلولی، هسته (0.00038) دارای فراوانی معنی‌دار بود. در بخش عملکرد مولکولی می‌توان به فعالیت اتصال DNA (0.004)، فعالیت فاکتورهای رونویسی (0.00093)، فعالیت تنظیمی فاکتورهای رونویسی (0.00023) اشاره نمود (شکل۴). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، بیشتر ژن‌های هاب در دسته فاکتورهای رونویسی قرار گرفتند که شامل چهار فاکتور رونویسی از خانواده AP2 (*HvCBF6*، *HvDRF1.3*، *LFL1* و *VP1*)، یک فاکتور رونویسی خانواده WRKY (*WRKY71*) و دو فاکتور رونویسی از خانواده bZIP (*ABI5* و Os02g0610500) بودند. همچنین دو ژن از خانواده کینازها (*CIPK31* و *CBL1*) و یک ژن از

خانواده پروتئین‌های شوک حرارتی (*BIP1*) به‌عنوان ژن هاب شناخته شدند.



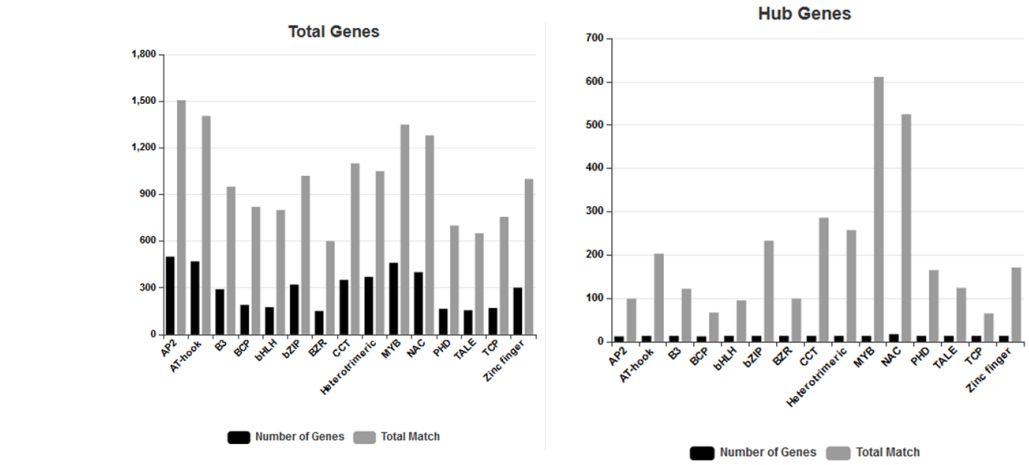
شکل ۴. بررسی هستی‌شناسی (فرایندهای زیستی (BP)، اجزای سلولی (CC)، عملکردهای مولکولی (MF)) ژن‌های هاب شناسایی‌شده در اندام‌های زایشی جو توسط نرم‌افزار تحت وب AgriGo.

تجزیه و تحلیل پروموتر و شناسایی فاکتورهای رونویسی اصلی تنظیم کننده مسیرهای پاسخ به تنش خشکی

جهت شناسایی فاکتورهای رونویسی کلیدی تنظیم‌کننده مسیرهای پاسخ به تنش خشکی، پروموتر ژن‌های دارای بیان افتراقی با بیان مساوی و بزرگ‌تر از ۲/۵ و مساوی وکوچکتر از ۲/۵- و ژن‌های هاب پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در مرحله نموی زایشی که در ۸۵ درصد (با P-Value اتصال کوچک‌تر از ۰/۰۵) از آنها دارای جایگاه شناسایی باشند، بررسی شدند (جدول ۲). براساس نتایج به‌دست‌آمده به‌نظر می‌رسد خانواده عوامل رونویسی AP2، خانواده عوامل رونویسی دارای دمین B3، خانواده AT-hook، خانوادهbHLH، خانواده bZIP، خانواده MYB، خانواده NAC و خانواده Zinc Finger عوامل رونویسی اصلی تنظیم‌کننده مسیرهای پاسخ به تنش خشکی در جو باشند. زیرا این فاکتورها دارای جایگاه اتصال در پروموتر ۸۵ درصد ژن‌های پاسخ‌دهنده به خشکی و ژن‌های هاب شناسایی‌شده (با P-Value اتصال کوچک‌تر از ۰/۰۵)، هستند (شکل ۵). علاوه بر این، برای هر خانواده از این عوامل رونویسی تعداد کل اتصالات در پروموتر ژن‌ها نمایش داده شده است.

نتایج به‌دست آمده در این پژوهش تایید کرد که فاکتورهای رونویسی نقش عمده‌ای در تنظیم بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در جو ایفا می‌کنند. فاکتورهای رونویسی به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های ژن هدف، در فرایندهای زیستی بسیار زیادی همچون رشد، نمو، پیشرفت چرخه سلولی، متابولیسم و پاسخ به محرک‌های محیطی دخیل می‌باشند و باعث سازگاری گیاه با شرایط نامساعد محیطی از جمله خشکی می‌شوند. این عوامل نه تنها به‌عنوان یک فعال‌کننده

مولکولی برای بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده عمل می‌کنند، بلکه به‌عنوان یک عامل اصلی در فرایندهای انتقال پیام در شبکه‌های زیستی نقش دارند (Budak *et al.*, 2013; Chen & Zhu, 2004; Shinozaki & Dennis, 2003; Yamaguchi-Shinozaki, 2005). فاکتورهای رونویسی با مناطق سیس–المنت در نواحی پروموتری ژن‌های مرتبط با تنش‌های محیطی برهم‌کنش می‌کنند و با افزایش بیان این ژن‌ها موجب تحمل به تنش می‌شوند. آنالیز داده‌های ترانسکریپتومی در آرابیدوپسیس و بسیاری از گیاهان، گویای این نکته است که تحمل یا حساسیت به تنش‌های محیطی در سطح رونویسی و با برهم‌کنش ژن‌های تنظیمی و عوامل رونویسی در شبکه‌های تنظیمی کنترل می‌شود (Fowler& Michael, 2002; Umezawa *et al.*, 2006). در جدول ۱ هفت فاکتور رونویسی، به‌عنوان ژن‌های هاب، گزارش شده است که متعلق به ۳ خانواده عوامل رونویسی bZIP، AP2 و WRKY می‌باشند.



شکل ۵. خانواده عوامل رونویسی شناسایی‌شده دارای جایگاه اتصال در پروموتر ژن‌های شناسایی‌شده دارای بیان افتراقی ≤۲/۵ و ≥۲/۵– و ژن‌های هاب شناسایی‌شده مرتبط با تنش خشکی در اندام‌های زایشی جو. نمودارهای با رنگ مشکی جایگاه اتصال برای هر خانواده در طول تمام پروموترها و نمودارهای با رنگ طوسی تعداد کل اتصالات پروموتری که به وسیله هر خانواده شناسایی می شود را نشان می‌دهد.

جدول ۲– شایع‌ترین خانواده‌های رونویسی شناسایی‌شده در پروموتر ژن‌های دارای بیان افتراقی ≤۲/۵ و ≥۲/۵ – و ژن‌های هاب دخیل در پاسخ به تنش در اندام‌های زایشی جو.

Domain	TF Family	Binding site in 85% of genes	
		Total Genes P-Value	Hub Genes P-Value
AP2	P$RAV5	3.35E-13	2.31407E-10
AT-hook	P$HMGF	3.86E-07	1.30262E-07
B3	P$RAV3	9.99E-49	9.99001E-52
BCP	P$GAGA	3.35E-06	1.31096E-06
bHLH	P$MYCL	0.00112	0.000790728
bZIP	P$OPAQ	0.000802	0.000552697
BZR	P$BRRE	2.89E-08	1.00118E-08
CCT	P$TODS	1.66E-06	7.51855E-07
Heterotrimeric	P$CAAT	1.5E-06	6.75055E-07
MYB	P$MIIG	0.001573	0.00113884
MYB	P$MYBL	0.02114	0.0202518
MYB	P$MYBS	0.014607	0.0127663
NAC	P$CNAC	1.27E-07	4.85362E-08
NAC	P$NACF	0.012107	0.0103755
NAC	P$NTMF	0.000113	6.77067E-05

PHD	P$SALT	1.64E-10	4.08346E-11
TALE	P$TALE	1.41E-17	1.25646E-18
TCP	P$TCPF	1.38E-05	6.18333E-09
Zinc finger	P$DOFF	0.009831	0.00825786

یکی از مهمترین خانواده‌های فاکتورهای رونویسی که بیشترین اتصال را با ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در این مطالعه دارند خانواده ERF/AP2 است که از بزرگ‌ترین خانواده‌های فاکتورهای رونویسی مختص عالم گیاهی می‌باشند (Song *et al*., 2013). اعضای این خانواده به ۴ زیر خانواده AP2 (Apetala2)، RAV (related to ABI3/VP1 و ERF DREB (dehydration-responsive element-binding protein) تقسیم می‌شوند (Sharoni *et al*., 2011; Rashidetal., 2012). از بین این زیر خانواده‌ها، خانواده عامل رونویسی DREB و ERF غالباً فراوانی بیشتری در پاسخ به خشکسالی، تنش شوری و تغییرات سریع دمایی و بیماری دارند (Nakashima *et al*.,2014). در این مطالعه نیز دو فاکتورهای رونویسی *HvCBF6* و *HvDRF1.3* به‌عنوان ژن‌های هاب از خانواده AP2 مشخص شده است. این ژن‌ها، در فعال سازی شبکه پیچیده تحمل به تنش خشکی در جو نقش دارند (Mizoi *et al*., 2012). با انتقال این ژن‌ها به گندم و جو، القای افزایشی بیان این ژن‌ها در گیاهان تراریخته باعث شد گیاهان تراریخته نسبت به گیاهان نرمال دارای رشد کمتر، تاخیر در گل‌دهی و کاهش بازده عملکرد دانه را از خود نشان دهند و باعث بقا گیاه در مقابل تنش خشکی گردد (Morran *et al*., 2011). از دیگر ژن‌های هاب شناسایی‌شده از این خانواده می‌توان به ژن‌های *LFL1* و *VP1* که دارای دمین B3 هستند اشاره کرد. بیان ژن *VP1* ژن توسط آبسزیک اسید تحریک شده و فرآورده پروتئینی آن به‌عنوان یک فاکتور رونویسی میزان بیان ژن‌های دیگر را در طی مرحله میانی و انتهای جنین زایی تنظیم می‌کند (Hu *et al*., 2006).

فاکتورهای رونویسی WRKY در تنظیم رشد و نمو گیاه و پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده نقش بسیار مهمی ایفا می‌کنند (Mingyu *et al*., 2012). در تنباکو با افزایش بیان ژن *TaWRKY10* از طریق انتقال ژن مذکور باعث بالاتر رفتن تحمل گیاه به تنش‌های خشکی و شوری ازطریق تنظیم فشار اسمزی و حذف گونه‌های فعال اکسیژن گردیده است (Wang *et al*., 2019). همچنین در آرابیدوپسیس مشخص شده است که فاکتور رونویسی WRKY25 از طریق تنظیم باز و بسته‌شدن روزنه باعث افزایش تحمل به تنش‌های غیر زنده شده است (Li *et al*., 2009). در پژوهش حاضر یک فاکتور رونویسی WRKY به‌عنوان ژن هاب شناسایی‌شده است که افزایش بیان این ژن تحت تنش خشکی و تنش‌هایی مانند شوری و سرما در برنج نیز گزارش شده است (Rushton *et al*., 2010). خانواده فاکتورهای رونویسی bZIP از خانواده‌هایی هستند که در پیام‌رسانی تنش‌های غیر زنده و در تنظیم پاسخ به تنش‌های غیر زنده در گیاهان نقش دارند (Gao *et al*., 2011). از فاکتورهای رونویسی شناسایی‌شده متعلق به این خانواده در این پژوهش ژن *ABI5* می‌باشد. طبق گزارشات ارائه شده این ژن با میانجی‌گری اسید آبسزیک می‌تواند در تحمل به تنش خشکی نقش آفرینی کند (Wang *et al*., 2019; Skubacz *et al*., 2016).

بررسی‌ها نشان داده‌اند که طیفی از محرک‌ها از جمله خشکی، شوری، دمای زیاد، هورمون‌ها و پاتوژن‌ها تغییراتی در سطح کلسیم سیتوزولی القا می‌کنند (Mohanta *et al*., 2015). در این میان پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم (CDPK) و

پروتئین‌های شبه کلسی نورین (CBL)، اصلی‌ترین گیرنده‌های کلسیمی در سلول‌های گیاهی هستند که نقش مهمی در انتقال پیام‌های مرتبط با کلسیم دارند (Shao et al., 2008) در این مطالعه ژن *CIPK31* از خانواده پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم و ژن CBL1 از خانواده پروتئین‌های شبه کلسی نورین به‌عنوان ژن هاب شناسایی شدند. که مسئول فرایندهای متعدد سلولی از جمله پاسخ به تنش‌های محیطی می‌باشند (Castells & Casacuberta, 2007).

براساس نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر، بسیاری از ژن‌های کلیدی دخیل در تحمل به تنش خشکی، ژن‌های تنظیمی مانند فاکتورهای رونویسی و پروتئین کینازها می‌باشند که جایگاه این ژن‌ها در شبکه‌های پاسخ به تنش در بالادست سایر ژن‌ها بوده و بیان ژن‌های پایین‌دست را تنظیم می‌نمایند و بنابراین از اهمیت به‌سزایی در ایجاد تحمل به تنش برخوردار می‌باشند. نتایج حاصل از این پژوهش در خصوص شناسایی ژن‌های هاب دخیل در تحمل جو می‌توانند در برنامه‌های دست‌ورزی ژنتیکی و اصلاحی برای تحمل به تنش خشکی در جو در جهت بالا بردن سطح تحمل به تنش خشکی مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

این پژوهش از پروژه تحقیقاتی مصوب در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران می‌باشد که بدین‌وسیله مورد تشکر و قدردانی قرار می‌گیرند.

REFERENCES

Abebe T , Melmaiee K, Berg V, Wise R (2010) Drought response in the spikes of barley: gene expression in the lemma, palea, awn, and seed. Funct Integr Genomics 10: 191–205.

Agrawala, S, Barlow M, Cullen H and Lyon B (2001). The drought andhumanitariancrisis incentral and south west Asia :a climate perspective.International Research Institute for ClimatePrediction,IRI Special Report,20:1-11.

Ahmed I, Huaxin D, Weite Zh, Fangbin C, Guoping Zh, Dongfa S and Feibo W (2013) Genotypic differences in physiological characteristics in the tolerance to drought and salinity combined stress between Tibetan wild and cultivated barley. Plant Physiol Biochem 63: 49-60.

Alghabari F, Muhammad Z (2018) Effects of drought stress on growth, grain filling duration, yield and quality attributes of barley (*Hordeum vulgare L.*). Bangl J Bot 47: 421-428.

Altschul SF, GishW, MillerW, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol Mol. 215(3): 403-410.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer A A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D J(1997) Gapped BLASTand PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs .Nucleic Acids Res. 25 (17):3389-3402.

Amini, R.(2013). Drought stress tolerance of barley (*Hordeum vulgare* L.) affected by priming with PEG. Intl J *Farm* & Alli Sci. 2(20): 803-808.

Arriagada O, Freddy M, Yerko Q , Alejandro D (2017) Identification of QTL underlying agronomic, morphological and physiological traits in barley under rainfed conditions using SNP markers. Acta Scientiarum. Agronomy 39: 321-329.

Budak H, Kantar M, Yucebilgili Kurtoglu K (2013) Drought tolerance in modernand wild wheat. TSWJ. 16.

Cartharius K, Kornelie F, Korbinian G, Bernward K, Manuela H, Andreas K, Matthias FM , and Thomas W(2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. Bioinformatics 21: 2933-2942.

Castells E, Casacuberta JM (2007) Signalling through kinase-defective domains: the prevalence of atypical receptor-like kinases in plants. J. Exp. Bot. 58(13): 3503-3511.

Chen WJ, Zhu T (2004) Networks of transcription factors with roles in environmental stress response. Trends Plant Sci. 9:591-596.

Food and Agriculater Organization (2014) FAO 2014 [WWW document]. http://faostat3.fao.org.

Fowler S, Michael FT (2002) Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. Plant Cell 14: 1675-1690.

Freeling M, Shabarinath S (2009) Conserved noncoding sequences (CNSs) in higher plants.

Curr Opin Plant Biol 12: 126-132.

Gao SQ, Chen M, Xu ZS, Zhao CP, Li L, Xu HJ, Tang YM, Zhao X, Ma YZ (2011). The soybean GmbZIP1 transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants. Plant Mol. Biol 75: 537-553.

Guo P, Michael B, Stefania G, Salvatore C, Guihua B, Ronghua L, Maria V, Rajeev K V, Andreas G, Jan V (2009) Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. J Exp Bot 60: 3531-3544.

Hackenberg M, Perry G, Peter L and BuJun Sh, (2015) Differential expression of micro RNA s and other small RNA s in barley between water and drought conditions. Plant Biotech J 13: 2-13.

Hu H, Mingqiu D, Jialing Y, Benze X, Xianghua L, Qifa Zh and Lizhong X (2006) Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 12987-12992.

Hübner S, Abraham BK and Karl JS (2015) RNA-Seq analysis identifies genes associated with differential reproductive success under drought-stress in accessions of wild barley Hordeum spontaneum. BMC Plant Biol 15: 134.

Janiak A, Kwasniewski M, Sowa M, Gajek K, Żmuda K, Kościelniak J and Szarejko I (2018) No Time to Waste: Transcriptome Study Reveals that Drought Tolerance in Barley May Be Attributed to Stressed-Like Expression Patterns that Exist before the Occurrence of Stress. Front. Plant Sci. 8:2212.

Li S, Fu Q, Huang W, Yu D (2009) Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor WRKY25 in heat stress. Plant Cell Rep. 28: 683-693.

Liang J, Xin Ch, Guangbing D, Zhifen P, Haili Zhang, Q, Kaijun Y, Hai L and Maoqun Y(2017) Dehydration induced transcriptomic responses in two Tibetan hulless barley (*Hordeum vulgare* var. nudum) accessions distinguished by drought tolerance. BMC genomics 18: 775.

Li J, Besseau S, Toronen P, Sipari N, Kollist H, Holm L, Palva ET (2013) bbDefense related transcription factors WRKY70 and WRKY54 modulate osmotic stress tolerance by regulating stomatalaperture in Arabidopsis. New. Phytol. 200: 457-472.

Mingyu Z, Zhengbin Z, Shouyi C, Jinsong Z, Hongbo S (2012) WRKY transcription factor superfamily: structure, origin and functions. AJB. 11: 8051-8059.

Mir R, Mainassara Zh, Nese S, Richard T and Rajeev K (2012) Integrated genomics, physiology and breeding approaches for improving drought tolerance in crops. Theor Appl Genet 125: 625-645.

Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012) AP2/ERFfamily transcription factors in planta biotic stress responses. Biochim. Biophys. Acta. 1819: 86-96.

Mohanta TK, Mohanta N, Mohanta YK, Parida P, Bae H (2015) Genome-wide identification of Calcineurin B-Like (CBL) gene family of plants reveals novel conserved motifs and evolutionary aspects in calcium signaling events. BMC Plant Biol. 15(1): 9-18.

Morran S, Eini O, Pyvovarenko T, Parent B, Singh R, Ismagul A, Eliby S, Shirley N, Langridge P, Lopato S (2011) Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. Plant Biotechnol. J. 9: 230-249.

Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2014) Thetranscriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. Front. PlantSci. 5:170.

Ozturk Z, Neslihan T, Deyholos Ml, Michalowski Ch, Galbraith D, Gozukirmizi N, Tuberosa R and Bohnert H (2002) Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. Plant Mol. Biol. 48: 551-573.

Rashid M, Guangyuan H, Guangxiao Y, Hussain J and Xu, Y (2012) AP2/ERF transcription factorin rice: genome-wide can vas and syntenic Relationships between monocots and eudicots. Evol. Bioinform.Online. 8: 321.

Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P ,Shen QJ (2010) WRKY transcription factors. Trends Plant Sci. 15: 247-258.

Shao H, Chu L, Jaleel CA, Zhao C (2008) Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. Comptes Rendus Biologies. 331(3): 215-225.

Sharoni AM, NuruzzamanM, Satoh K, Shimizu T, Kondoh H, Sasaya T et al (2011) Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice. Plant Cell Physiol. 52: 344-360.

Shinozaki K, Dennis ES (2003) Cell signalling and gene regulation: global analyses of signal transduction and gene expression profiles. Curr. Opin. Plant Biol. 6: 405-409.

Singh A, Giri J, Kapoor S, Tyagi AK, Pandey GK (2010) Protein phosphatase complement in rice: genome-wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development. BMC Genomics 11(1): 435.

Skubacz A, Daszkowska-Golec Aand Szarejko I (2016) The Roleand Regulation of ABI5 (ABA-Insensitive 5) in Plant Development,

Abiotic StressResponses and Phytohormone Crosstalk. Front. Plant Sci. 7:1884.

Smoot ME, Keiichiro O, Johannes R, Peng-Liang W and Trey I, 2011. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. Bioinformatics 27: 431-432.

Song X, Li Y, Hou X (2013) Genome-wideanalysis of the AP2/ERF Transcription factors upper family in Chines ecabbage (*Brassicarapa* ssp. pekinensis). BMCGenomics 14:573.

Szklarczyk D, Andrea F, Stefan W, Kristoffer F, Davide H, Jaime HC, Milan S, Alexander R, Alberto S and Kalliopi PT (2014) STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. Nucleic Acids Res.

Talamè V, Neslihan Z, Hans J, Roberto T(2006) Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. J Exp Bot 58: 229-240.

Tian T, Yue L, Hengyu Y, Qi Y, Xin Y, Zhou D, Wenying X and Zhen S (2017) agriGO v2. 0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. Nucleic Acids Res. 45: 122-129.

Tran L, Keiichi M (2010) Functional genomics of soybean for improvement of productivity in adverse conditions. Funct Integr Genomics 10: 447-462.

Umezawa T, Miki F, Yasunari F, Kazuko Y and Kazuo Sh (2006) Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. Curr Opin Biotechnol 17: 113-122.

Wang, N., Xu, S., Sun, Y. et al (2019) The cotton WRKY transcription factor (GhWRKY33) reduces transgenic Arabidopsis resistance to drought stress. Sci Rep. 9: 724.

Wang X,Zeng J, Li Y, Rong X, Sun J, Sun T, Li M, Wang L, Feng Y, Chai R, Chen M, Chang J, Li K, Yang Gand He G (2015) Expression of TaWRKY44 wheat WRKY gene ,in transgenic tobacco confers multiple abiotic stress tolerances. Front. PlantSci. 6: 615.

Wani SH, Singh NB, Devi TR, Haribhushan A, Jeberson SM, Malik C P (2013) Engineering abiotic stress tolerance in plants:extricating regulatory gene complex in Conventional and Non-Conventional Interventions in Crop Improvement, eds C.P. Malik, G.S. Sanghera and S.H. Wani (New Delhi: CABI), 1-19.

Worch S, Rajesh K, Harshavardhan V, Pietsch Ch, Korzun V, Kuntze L, Börner A, Wobus U, Röder M, Sreenivasulu N (2011) Haplotyping, linkage mapping and expression analysis of barley genes regulated by terminal drought stress influencing seed quality. BMC Plant Biol 11:1.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic-and cold-stress-responsive promoters. Trends Plant Sci. 10: 88-94.

Zhang X, Xiaohong L, Wenzhi W, Tingjun Zh, Xiaomin Z, Guobao X, Guoju W and Huhu K (2018) Spatiotemporal variability of drought in the northern part of northeast China. HYDROL PROCESS 32: 1449-1460.

Zheng J, Junjie F, Mingyue G, Junling H, Yunjun L, Min J, Quansheng H, Xiying G, Zhigang D and Hongzhi W (2010) Genome-wide transcriptome analysis of two maize inbred lines under drought stress. Plant Mol. Biol 72: 407-421.

Zlatev Zlatko, C. L. F. (2012) An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis." Emir. J. Food Agric: 24(1): 57-72.