

بررسی گروه‌های کارکردی و تغییرات الگوی بیان ژن‌ها در گیاه C3 برنج و C4 ذرت تحت تنش خشکی با استفاده از تجزیه و تحلیل داده‌های ریزآرایه

صدیقه اخترطاوان^۱، مجید طالبی^{۲*}

۱. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران
۲. دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۳۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۹/۲۹)

The Study of Functional Groups and Changes in Genes Expression Pattern of Rice (C3) and Maize (C4) under Drought Stress using Microarray Data Analysis

Sedigheh Akhtartavan¹, Majid Talebi^{2*}

1. Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran.
2. Department of Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
(Received: Sep. 21, 2016 - Accepted: Dec. 1, 2016)

Abstract

Drought is one of the major environmental stresses that greatly affects growth and development of plants. The plants reaction against this stress is associated with showing massive changes in complex gene networks. In the present study, the changes of gene expression patterns in two sensitive and tolerant genotypes of rice (as C3 plant) and maize (as C4 plant) were investigated using maize genome arrays containing 17,734 probe sets and the rice genome containing 57/381 probe set. The microarray data were taken from the GEO/NCBI database on both stress and control conditions to identify the genes involved in responses to the stress. The results indicated that 1861 (10.49%) and 1753 (8.9%) genes in the sensitive and tolerant maize, respectively, and 9252 (16%) and 7971 (13.8%) genes in the sensitive and tolerant rice, respectively, changed significantly after drought stress at the level of one percent. From of these genes, 1012 and 175 genes in the sensitive and tolerant genotype leaf of rice and maize, were significantly up-regulated, respectively. The Venn diagram showed that 663 genes of rice and 158 genes of maize, have significantly down-regulated. Rice plant, as a C3 plant, showed five times wider reaction to drought stress in compared with maize plant, as a C4 plant. The functional grouping of the up-regulated genes in two species revealed that functional group of ribosomal proteins and phosphatases in maize plant have the most abundant categories, whereas the functional groups of metal-binding, stress response, response to biological stimuli and signals in rice plant contained the highest percentage of the genes.

Keywords: Drought stress, *Zea mays*, *Oryza sativa*, Microarray analysis

چکیده

خشکی یکی از عمده‌ترین تنش‌های محیطی محسوب می‌شود که رشد و توسعه گیاهان را تا حد زیادی تحت تاثیر قرار می‌دهد. واکنش‌های گیاهان در برابر این تنش با بروز تغییرات زیاد در شبکه‌های پیچیده حاوی تعداد زیادی ژن همراه است. در پژوهش حاضر تغییرات الگوی بیان ژن‌ها در دو ژنوتیپ حساس و متحمل گیاه برنج (به‌عنوان گیاه C3) و گیاه ذرت (به‌عنوان گیاه C4) با استفاده از آرایه‌های ژنوم ذرت شامل ۱۷/۳۸۱ پروب‌ست و ژنوم برنج شامل ۵۷/۳۸۱ پروب‌ست مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های ریزآرایه، جهت شناسایی ژن‌های درگیر در پاسخ به تنش در دو شرایط کنترل و تنش از بانک اطلاعاتی GEO/NCBI گرفته شد. نتایج نشان داد که به ترتیب تعداد ۱۸۶۱ (۱۰/۴۹ درصد) و ۱۷۵۳ (۹/۸ درصد) ژن در ژنوتیپ حساس و متحمل ذرت و تعداد ۹۲۵۲ (۱۶ درصد) و ۷۹۷۱ (۱۳/۸ درصد) ژن در ژنوتیپ حساس و متحمل برنج پس از تنش خشکی در سطح یک درصد تغییر بیان معنی‌داری داشتند. از این تعداد به ترتیب ۱۰۱۲ و ۱۷۵ ژن در برگ ژنوتیپ متحمل و حساس برنج و ذرت افزایش بیان معنی‌داری نشان دادند. دیاگرام ون نشان داد که به ترتیب تعداد ۶۶۳ و ۱۵۸ ژن به ترتیب و به صورت مشترک در ارقام متحمل و حساس برنج و همچنین ذرت کاهش بیان معنی‌داری دارند. گیاه برنج (به‌عنوان گیاه C3) پنج برابر در مقایسه با گیاه ذرت (به‌عنوان گیاه C4) واکنش گسترده‌تری به تنش خشکی از خود نشان داد. گروه‌بندی کارکردی ژن‌های دارای افزایش بیان در دو گونه گیاهی مشخص کرد که در ذرت گروه کارکردی پروتئین‌های ریبوزومی و فسفاتازها دارای بیشترین تعداد ژن هستند در حالیکه در برنج گروه‌های کارکردی اتصال به فلزات، پاسخ به تنش، پاسخ به محرک‌های زیستی و انتقال پیام بیشترین ژن‌ها را شامل شدند.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، ذرت، برنج، تجزیه و تحلیل میکروآرای.

مقدمه

تنش خشکی دارای توان آسیب‌رسانی می‌باشد که به‌صورت یک متابولیسم غیرعادی روی داده و ممکن است به صورت افت رشد، مرگ گیاه و یا مرگ بخشی از گیاه بروز کند (Xiong *et al.*, 2002). تنش‌های غیرزنده مانند خشکی، شوری و دمای بالا عملکرد گیاهان را ۵۰ درصد کاهش می‌دهند (Mott and Wang 2007). گیاهان به منظور زنده ماندن طیف وسیعی از سازگاری‌های مولکولی، سلولی، فیزیولوژیکی و متابولیکی در پاسخ به تنش خشکی اعمال داشته‌اند (Bohnert, 1993; Bray, 1993; *et al.*, 1995). خشکی بلند مدت در گیاهان C3 و C4 موجب اختلال در انواعی از فرایندهای فیزیولوژیکی به ویژه مهار فتوسنتز می‌شود (Chaves, 2007; Hura *et al.*, 1991). کارایی اکوسیستم تابع تغییر در فروانی نسبی گروه‌های عاملی گیاهی (C3 در برابر C4) در سیستم‌های طبیعی می‌باشد (Epstein, 1998). علاوه بر این مشخص شده پتانسیل تولید گیاهان C3 (به‌عنوان مثال برنج) و گیاهان C4 (به‌عنوان مثال ذرت) به‌علت خشکسالی‌های مکرر دچار کاهش عملکرد شده‌اند (Chaves and Perira 1992). برنج غذای اصلی بیش از نیمی از جمعیت جهان، به‌ویژه کشورهای در حال توسعه است و به همراه ذرت و گندم ۵۰ درصد کالری کل جمعیت جهان و به تنهایی ۸۰ درصد کالری اکثر مردم آسیا می‌باشد (Maclean and Dawe, 2002). واکنش گیاهان به تنش آب به طور قابل توجهی وابسته به شدت تنش، مدت تنش، گونه گیاهی و مرحله تکامل آن است (Chaves *et al.*, 2003). در ایران کشت ذرت در سال‌های اخیر رونق یافته و استفاده از آن در تغذیه دام و طیور و مصارف صنعتی مورد توجه قرار گرفته است. از طرفی تامین آب مورد نیاز در مراحل خاص رشد رویشی و زایشی این گیاه که فوق العاده حساس نسبت به تنش رطوبتی در مراحل مختلف می‌باشد و همچنین تعیین

بهترین تراکم پیشنهادی در این رابطه از اهمیت خاصی برخوردار است. گیاهان C3 و C4 با توجه به ساختار، عملکرد و همچنین برای تامین نیازهای آب و هوایی خود در اقلیم‌های متفاوت تکامل یافته‌اند (Ward *et al.*, 1999; Nayyar, 2003). در حالی که مبدا گیاهان C3 مناطق معتدل می‌باشد گیاهان C4 در مناطق گرمسیری و خشک تکامل یافته‌اند (Ward *et al.*, 1999). گیاهان C4 به دلیل داشتن آناتومی برگ متمایز، کلروپلاست دیمورفوسیم، دو مسیر کربوکسیلاسیون شامل فسفوانول‌پیروات کربوکسیلاز^۱ (PEPC) در مزوفیل برگ و ریبولوز ۵وایی فسفات کربوکسیلاز (RUBISCO)^۲ در سلول‌های غلاف آوندی، تنفس نوری ناچیز و مکانیسم CO₂ متمرکز، بر گیاهان C3 برتری دارند (Ward *et al.*, 1999; Nelson *et al.*, 2004). تنش کمبود آب به دلیل عدم تعادل بین جذب نور موجب مهار فعالیت فتوسنتزی و القای استرس اکسیداتیو می‌گردد (Nocter *et al.*, 2002). تحقیقات نشان داده که گیاهان C4 در مقایسه با گیاهان C3 با افزایش بهره‌وری از راندمان مصرف آب و سرکوب تنفس نوری دارای توان رقابتی بالاتری در تنش خشکی بوده و مستعد مناطق خشک می‌باشند (Edwards and Ku, 1987). گیاهان طیف وسیعی از سازگاری‌های مولکولی، سلولی، فیزیولوژیکی و متابولیکی در پاسخ به تنش خشکی اعمال داشته‌اند (Bohnert *et al.*, 1993; Bray, 1995). مطالعات نشان داده‌اند که چندین سیستم تنظیم بیان ژن در پاسخ به تنش‌ها دخالت دارند (Shinozaki, 1997; Ingram and Bartels, 1996). محصولات ژن‌های القا شده در تنش خشکی را می‌توان به دو دسته کلی تقسیم‌بندی نمود: ۱- آن‌هایی که مستقیماً در برابر تنش‌ها نقش حفاظتی

1. Phosphoenolpyruvate carboxylase

2. Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase

چندگانه فراهم می‌کند، قبل از پیشرفت این تکنیک تعیین زمانی و مکانی یک ژن که رونویسی می‌شود، تلاشی زمان‌بر و دشوار بود. میکروآرای امکان جدیدی را برای جستجوی بیولوژیکی شامل توضیح ژن‌ها در فرایندهای ویژه مانند چرخه سلولی و رشد و پیشرفت، ارزیابی اثر اختلالات شیمیایی و ژنتیکی و شناسایی ژن‌های مرتبط با انواع بیماری‌ها فراهم آورد (Zali *et al.*, 2013). فن‌آوری میکروآرای یکی از ابزارهای قدرتمند برای مطالعه بیان ژن در مقیاس ژنوم است در این مطالعه با استفاده از داده‌های میکروآرای و نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی به بررسی و مقایسه الگوی بیان ژن‌ها و تعیین گروه‌های کارکردی ژنوتیپ حساس و متحمل در گیاه برنج و ذرت به‌منظور بهبود درک ما از فرایندهای دخیل در تنش خشکی و خصوصیات مولکولی گیاهان C3 و C4 و همچنین معرفی ژن‌ها و گروه‌های کارکردی مهم که در ایجاد مقاومت در برابر تنش نقش بسزایی داشتند پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

جامعه آماری مورد مطالعه شامل داده‌های میکروآرای در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به تنش در دو جنس مختلف از خانواده گرامینه شامل برنج (به‌عنوان گیاه C3) و ذرت (به‌عنوان گیاه C4)، که مجموعه داده‌های میکروآرای مربوطه از پایگاه داده GEO/NCBI^۱ دانلود گردید. در این پژوهش ابتدا داده‌های میکروآرای مورد نیاز شرایط کنترل و تنش، جمعاً حدود ۱۶ نمونه به ترتیب در برگ ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به تنش ذرت رقم حساس Ye478 و رقم مقاوم Han21 [PlatformsGPL4032] و برنج رقم RR4530 [PlatformsGPL2025]

دارند ۲- آن‌هایی که بیان ژن و انتقال پیام را کنترل می‌کنند (Hasegawa *et al.*, 2000). شناخت کامل مکانیسم‌های تحمل و ژن‌های درگیر در پاسخ به تنش می‌تواند باعث بهبود تحمل به تنش‌های مختلف در گیاهان زراعی با روش‌هایی چون دست‌کاری‌های ژنتیکی گردد. بنابراین شناسایی و درک مسیرهای متفاوت پاسخ به تنش‌ها، در اصلاح و بهبود عملکرد گیاهان نقش بسیار مهمی دارد (Lee *et al.*, 2005). به این ترتیب پژوهشگران با شناخت الگوی رفتاری گیاه و شناسایی پارامترهای مؤثر فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، زمینه‌های لازم برای اصلاح مولکولی و مهندسی متابولیک گیاه جهت رسیدن به یک سیستم کشاورزی پایدار را کسب می‌نمایند. در سال‌های اخیر انفجاری در پیشرفت تکنیک‌هایی با تکنولوژی بالا برای دستیابی و نشان دادن جنبه‌های مختلف فعالیت ژن به‌وجود آمده است. اکنون با استفاده از این تکنولوژی‌های جدید، شناسایی ارتباطات بین ژن‌ها با قدرت تفکیک‌پذیری بالاتر نسبت به گذشته ممکن شده است، برای مثال خیلی زود این امکان وجود خواهد داشت که نقشه کل مجموعه فعل و انفعالات پروتئین برای هر ارگانیسم نیز مشخص شود. دسترسی این مجموعه داده وسیع ژنوم یک فرصت بی‌نظیر برای کشف ویژگی‌های سلولی جدید از منظر سیستمی می‌دهد و توانایی دانشمندان را در پیش‌بینی صحیح عملکرد ژن در حجم‌های وسیع افزایش می‌دهد. در بین تکنولوژی‌های بسیار پیشرفته اخیر که بیشتر عمومی هستند، میکروآرای DNA از مشهورترین آن‌ها است. میکروآرای، سطوح بیانی هزاران ژن را به طور همزمان (با توان بالا)^۲ مورد بررسی قرار داده و یک تصویر کلی^۳ (پروفایل) از فعالیت رونویسی در شرایط

1. Microarray

2. Experiments High Throughput

3. Profile

4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

در دو تکرار بیولوژیکی از بانک ژن [Affymetrix Rice Genome Array] در دو تکرار بیولوژیکی از بانک ژن (جدول ۱).

جدول ۱. مجموعه داده‌های ژنوتیپ حساس و متحمل ذرت و برنج

Samples	Geotype	ID
Platforms: GPL4032 Affymetrix Maize Genome Array		
Tolerance	Han21 control, biological rep1	GSM415900
	Han21 control, biological rep2	GSM415901
	Han21 drought, biological rep1	GSM415921
	Han21 drought, biological rep2	GSM415939
Sensitive	Ye478 control, biological rep1	GSM415944
	Ye478 control, biological rep2	GSM415945
	Ye478 drought, biological rep1	GSM415946
	Ye478 drought, biological rep2	GSM415947
	Platforms: GPL2025 Affymetrix Rice Genome Array	
Tolerance	Red rice 4530-drought-control-A	GSM540084
	Red rice 4530-drought-control-B	GSM540085
	Red rice 4530-drought stressed -A	GSM540086
	Red rice 4530-drought stressed -B	GSM540087
Sensitive	Red rice 4530-drought-control-A	GSM540080
	Red rice 4530-drought-control-B	GSM540081
	Red rice 4530-drought stressed -A	GSM540082
	Red rice 4530-drought stressed -B	GSM540083

نمودار ون^۴ با نرم‌افزار FlexArray انجام گرفت. نمودار ون در واقع همپوشانی^۵ که همان خروجی داده‌های مشترک حاصل از مقایسه تیمارها است، را نشان می‌دهد. دسته‌بندی کارکردی ژن‌های دارای افزایش بیان در دو گونه گیاهی با استفاده از آنالیز GO enrichment به همراه Benjamini Corrected P-values در پایگاه داده‌های David^۶ انجام گردید و ژن‌های گروه‌های عملکردی به صورت Heatmap نمایش داده شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از آزمون t-Bayesian با استفاده از آرایه‌های ژنوم ذرت محتوی (۷۳۴/۱۷ پروب ست) و ژنوم برنج (۳۸۱/۵۷ پروب ست) نشان داد که به طور کلی بیان ۱۸۶۱ (۱۰/۴۹ درصد) و ۱۷۵۳ (۹/۸ درصد) ژن در ژنوتیپ حساس و متحمل ذرت و

به دنبال آن جهت تجزیه و تحلیل پروفایل بیان ژنی و تعیین ژن‌های با افزایش بیان^۱ و کاهش بیان^۲ عملیات تفکیک، نرمال‌سازی، دسته‌بندی و ارزش‌گذاری داده‌ها و مقایسه بین گروه‌های مختلف در نرم‌افزار FlexArray انجام گرفت. در نرم‌افزار FlexArray داده‌ها با روش RMA نرمال شدند RMA یک روش معقول برای ارزیابی و نرمال‌سازی دقیق آرایه‌ها می‌باشد (Bolstad *et al.*, 2003; Irizarry *et al.*, 2003).

برای تعیین تفاوت معنی‌داری بین شرایط تنش و کنترل از آزمون Bayesian t-test استفاده شد. در این پژوهش جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از fold change بر مبنای Log2ratio داده‌های نرمال شده (نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در شرایط تنش خشکی به حالت کنترل) و $P\text{-value} < 0.01$ به عنوان معیار آماری معنی‌دار استفاده شد. آنالیز آماری و رسم

4. Venn diagram

5. Overlap

6. <https://david.ncifcrf.gov/>

1. Over expressed

2. Down expressed

3. Robust multichip average

عملکردی هستند که در واقع مقاومت به استرس‌های زنده ایجاد می‌کنند شامل مولکول‌هایی از قبیل چاپرون‌ها، پروتئین‌های تاخیر در جوانه‌زنی^۱ (LEA)، پروتئین‌های شوک حرارتی^۲ (HSP)، آنزیم‌های تنظیم‌کننده فشار اسمزی، آنتی‌فریزها، پروتئین‌های باند شده با mRNA، پروتئین‌های کانال آب، انتقال‌دهنده‌های پرولین و شکر، آنزیم‌های ضد مسمومیت و انواع پروتازها، گروه دوم پروتئین‌های تنظیمی هستند در واقع ژن‌هایی که سیگنال‌های رونویسی و بیان ژن‌های پاسخ دهنده به استرس را کنترل می‌کنند شامل انواع فاکتورهای رونویسی، پروتئین کینازها، پروتئین فسفاتازها و آنزیم‌های درگیر در متابولیسم فسفولیپیدها و سایر سیگنال‌های مولکولی می‌باشند (Shinozaki, 2003; Shinozaki and Yamaguchi, 2007; Ashburner *et al.*, 2000).

در پژوهش حاضر آبسزیک اسید (ABA) در هر دو گونه گیاهی در پاسخ به تنش خشکی بیان معنی‌داری در برنج (+۵/۳ برابر) و در ذرت (۴+ برابر) نشان داد، که به نوبه خود ناشی از بیان شمار زیادی از ژن‌های پاسخ‌دهنده به خشکی بوده و به طور کلی وجود مسیرهای وابسته به آبسزیک‌اسید را تحت تنش خشکی تایید می‌نماید. پاسخ به مکانیزیم ABA به‌طور گسترده در دهه‌های گذشته به خصوص با استفاده از آرآیدوپسیس به‌عنوان گیاه مدل مورد مطالعه قرار گرفته است. بررسی بیان ژن‌های القاء‌پذیر به‌وسیله تنش در گیاه آرآیدوپسیس دو مسیر تنظیمی مستقل از ABA در پاسخ به تنش‌های خشکی شوری زیاد و سرما آشکار کرده است. ۹۸ درصد مسیرهای مستقل از آبسزیک‌اسید شامل مسیر بیان ژن‌های خانواده *DREB*^۳ (Nakashima, Ito & Yamaguchi-Shinozaki,)

۹۲۵۲ (۱۶درصد) و ۷۹۷۱ (۱۳/۸درصد) ژن در ژنوتیپ حساس و متحمل برنج پس از خشکی در سطح یک درصد تفاوت معنی‌داری با شرایط کنترل دارند. این نتایج نشان داد که گیاه برنج (به‌عنوان گیاه C3) پنج برابر در مقایسه با گیاه ذرت (به‌عنوان گیاه C4) واکنش گسترده‌تری به تنش خشکی از خود نشان داده است. در تنش خشکی به‌ترتیب ۲۰۴۳ و ۲۵۷۱ ژن در ژنوتیپ حساس و متحمل برنج، و ۳۸۹ و ۳۶۴ ژن در ژنوتیپ حساس و متحمل ذرت، در مقایسه با شرایط کنترل افزایش بیان معنی‌داری نشان دادند (جدول ۲). با توجه به نتایج حاصل از پروفایل بیان ژنی گیاه برنج و ذرت (جدول ۲) ژنوتیپ حساس در هر دو گونه گیاهی C3 و C4 دارای سطح بیان بیشتری نسبت به ارقام متحمل هستند. سطح بیان بالاتر ژن‌ها در ارقام حساس نسبت به ارقام متحمل در مقایسه دو رقم برنج FL478 (به‌عنوان رقم مقاوم) و IR29 (به‌عنوان رقم حساس) تحت تنش شوری و همچنین در مقایسه دو رقم ذرت تحت تنش خشکی گزارش شده است (Walia *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, Degenkolbe *et al.*, 2009; 2010). اگرچه سطح بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به خشکی در ارقام حساس برنج و ذرت بیشتر از ارقام متحمل بود اما مقدار زیادی هم‌پوشانی در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل هرگونه گیاهی دیده شد که با توجه به نتایج نمودار ون به ترتیب ۱۰۱۲ و ۱۷۵ ژن مشترک دارای بیشترین بیان در ارقام حساس و متحمل برنج و ذرت تشخیص داده شد (شکل ۱- الف و ب). با توجه به نتایج به دست آمده به وسیله آنالیز میکروآرای (جدول ۳) ژن‌های القایی در تنش خشکی در دو گروه عملکردی تنظیمی و طبقه‌بندی می‌شوند. گروه اول شامل پروتئین‌های

1. Late Embryogenesis Abundant

2. Heat Shock proteins

3. Dehydration Responsive Element Binding-Proteins

Os4325697) و در ژنوتیپ متحمل ذرت (به‌عنوان گیاه C4) بیشترین افزایش بیان مربوط به ژن‌های کدکننده پروتئین کینازها (LOC-Zm100283735-LOC-Zm100282774) بود. گیرنده‌های کیناز به‌عنوان تنظیم‌کننده فعالیت سلولی چون تمایز و رشد سلولی عمل می‌کند (Neves et al., 2002). دو نوع سیستم پیام‌رسانی کینازها شامل هیستیدین کینازها و MAP کینازها در پاسخ به تنش‌های محیطی شناسایی شده‌اند هیستیدین کینازها گروهی از مولکول‌های سنسور که بی شک در پاسخ اولیه به تنش اسمزی دخالت دارند، که اولین بار در باکتری‌ها شناسایی شده‌اند (Wurgler-Murphy and Saito, 1997). این کینازها تغییراتی را در محیط احساس می‌نمایند که باعث اتوفسفورلاسیون یک زنجیره هیستیدین می‌شود و در نتیجه آن، فسفات به زنجیره اسپارتیک موجود در مولکول گیرنده منتقل می‌شود. هیستیدین کینازها در گیاهان، به‌عنوان گیرنده برای هورمون‌های اتیلین و سیتوکینین عمل می‌نمایند (Chang and Stewart, 1998; Inoue et al., 2001). شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد اولین مرحله انتقال سیگنال وجود تنش خشکی در سلول‌های گیاهی، با دخالت مسیرهای MAP کیناز صورت می‌گیرد. برای نمونه، تغییر در سیالیت غشای پلاسمایی ممکن است سبب تغییر ساختاری در مولکول گیرنده شود که این امر در فعال نمودن کیناز فرودستی نقش دارد.

اطلاعات عمده در زمینه چگونگی کارکرد سیستم پیام‌رسانی MAP کیناز در گیاهان، از مطالعه بر روی عکس العمل گیاه در برابر پاتوژن‌ها و نیز به تنش‌های سرما و شوری به دست آمده است. ممکن است گیاهان برای پیام‌دهی وجود تنش خشکی، سرما و شوری، از مسیرهای MAP مشابهی استفاده نمایند و اختصاصی بودن واکنش به یک تنش معین، به وسیله دوام عمل واکنش‌دهی و تشکیل کمپلکس با سایر پروتئین‌ها تعیین شود.

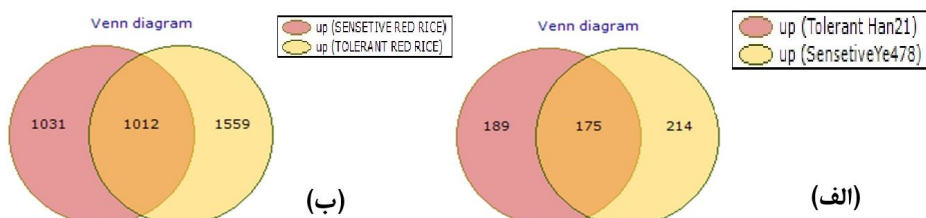
ژن‌های HD-ZIP¹ و NAC (Simpson et al., 2003) می‌باشند. در تنش خشکی، ABA با کاهش غلظت پتاسیم در سلول‌های محافظ روزنه، منجر به بسته شدن روزنه‌ها گردیده، که این امر سبب کاهش هدر روی آب از سلول محافظ می‌شود. به جز پیام‌های ارسالی از سلول‌های پساییده مجاور روزنه، پیام‌های اولیه از ریشه به سمت سلول محافظ روزنه، سبب افزایش تولید ABA و بسته شدن روزنه‌ها می‌شود بیش از نیمی از ژن‌های القاپذیر به وسیله تنش خشکی با تنش شوری و یا تیمار آبسزیک‌اسید هم‌قائه می‌شوند که دلیل بر وجود تداخل معنی‌داری بین پاسخ‌های گیاه به تنش خشکی، شوری و اسیدآبسزیک می‌باشد (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

بیان بسیاری از ژن‌های القاء شده توسط تنش خشکی از طریق آزمایش ریزآزایه‌ها شناسایی شده، که فرآورده‌های آن‌ها تحمل به تنش را افزایش داده و از طریق مسیرهای انتقال پیام، بیان ژن‌های دیگر را تنظیم می‌کنند. بیشتر این ژن‌ها با افزایش سطح آبسزیک اسید در گیاه ارتباط دارند (Raghavendra et al 2010). تحت تنش شوری غلظت ABA تا ۴۰ برابر افزایش نشان داد (Pierce and Raschke, 1980).

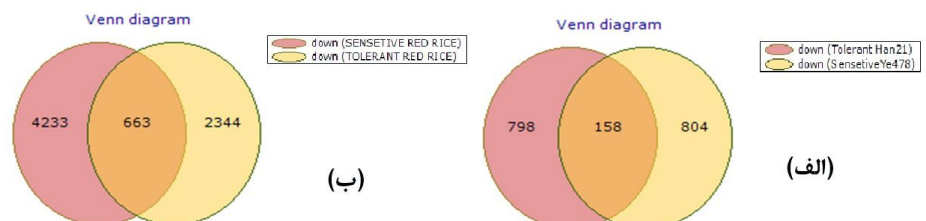
افزایش غلظت ABA تحت تنش شوری و خشکی، منجر به فعال شدن یک سری مسیرهای متابولیکی و بیان یک سری ژن‌های رمز کننده پروتئین‌ها، چاپرون‌ها، پروتئین‌های مشابه LEA، آنزیم‌های متابولیسم قندها و پروتئین‌های تنظیم‌کننده‌ای عوامل رونویسی می‌شود (Rock, 2000). آنالیز مقایسه‌ای و بررسی بیان ژن‌ها (جدول ۳) نشان داد در ژنوتیپ متحمل برنج (به‌عنوان گیاه C3) بیشترین افزایش بیان مربوط به پروتئین‌های شوک حرارتی (LOC-Os4330933-LOC-)

جدول ۲. مجموعه ژن‌های بیان شده در ژنوتیپ حساس و مقاوم برنج و ذرت

Sensitive genotype <i>Oryza sativa</i> (Red rice)	Tolerance genotype <i>Oryza sativa</i> (Red rice)	Sensitive genotype <i>Zea mays</i> (Ye478)	Tolerance genotype <i>Zea mays</i> (han21)	ژنوتیپ
57/381		17/734		(Prob Sets)
2043	2571	389	364	ژن‌های با افزایش بیان
3007	4169	963	956	ژن‌های با کاهش بیان
5050	6767	1351	1320	مجموع (ژن‌های با افزایش و کاهش بیان)
663		158		ژن‌های مشترک با کاهش بیان در هر دو ژنوتیپ
1012		175		ژن‌های مشترک با افزایش بیان در هر دو ژنوتیپ



شکل ۱. نمودار ون ژن‌های با افزایش بیان در پاسخ به تنش خشکی (الف) در ژنوتیپ حساس و متحمل برنج (ب) ژنوتیپ حساس و متحمل ذرت



شکل ۲. نمودار ون ژن‌های با کاهش بیان در پاسخ به تنش خشکی (الف) در ژنوتیپ حساس و متحمل برنج (ب) در ژنوتیپ حساس و متحمل ذرت

جدول ۳. ژن‌های شاخص با افزایش بیان در گیاه ذرت و برنج

Reaction ID	Locus ID
<i>Upregulated genes in Zea mays</i>	
hexokinase-1	(LOC-Zm100283735)
inositol-tetrakisphosphate 1-kinase 3	(LOC-Zm100282774)
serine/threonine-protein kinase SnRK2.2(SnRK2.2)	(LOC-Zm100192497)
50S ribosomal protein L12, chloroplastic	(LOC-Zm100277261)
40S ribosomal protein S12	(LOC-Zm100193804)
40S ribosomal protein S14	(LOC-Zm100286294)
40S ribosomal protein S15	(LOC-Zm100281004)
40S ribosomal protein S23	(LOC-Zm100192600)
40S ribosomal protein S28	(LOC-Zm100280715)
40S ribosomal protein SA	(LOC-Zm100282918)
16.9 kDa class I heat shock protein 1	(LOC-Zm100280576)
chloroplast small heat shock protein	(LOC-Zm100283886)
protein phosphatase 2C	(LOC-Zm100282657)

DHN2-like protein	(LOC-Zm101027100)
FYVE zinc finger family protein	(LOC-Zm100281249)
metallothionein-like protein type 2	(LOC-Zm100280857)
nucleic acid binding protein	(LOC-Zm100280461)
CIPK-like protein 1	(LOC-Zm100284454)
2C-type protein phosphatase protein(PP2C26)	(LOC-Zm100383423)
<i>Upregulated genes in Oryza sativa</i>	
16.0 kDa heat shock protein, peroxisomal	(LOC-Os4340661)
16.9 kDa class I heat shock protein 1	(LOC-Os4325697)
16.9 kDa class I heat shock protein 2	(LOC-Os4325698)
16.9 kDa class I heat shock protein 3	(LOC-Os4325696)
18.1 kDa class I heat shock protein	(LOC-Os4332361)
18.6 kDa class III heat shock protein	(LOC-Os4330933)
23.2 kDa heat shock protein	(LOC-Os4335956)
24.1 kDa heat shock protein, mitochondrial	(LOC-Os4330786)
26.7 kDa heat shock protein, chloroplastic	(LOC-Os4332237)
heat stress transcription factor C-2a	(LOC-Os4328809)
heat stress transcription factor C-2b	(LOC-Os4341273)
chaperone protein ClpB3, mitochondrial	(LOC-Os4328515)
chaperone protein ClpC2, chloroplastic	(LOC-Os4351828)
abscisic stress-ripening protein 3	(LOC-Os4325395)
serine/threonine-protein kinase pakF	(LOC-Os4334727)
dehydrin Rab25	(LOC-Os4326935)
dehydrin Rab16B	(LOC-Os4350453)
dehydrin Rab16C	(LOC-Os4350452)
dehydrin Rab16D	(LOC-Os4350451)
dehydrin Rab16E	(LOC-Os4350453)
dehydrin COR410	(LOC-Os4330265)
stress protein A-like protein	(LOC-Os4324029)
stress protein A-like protein	(LOC-Os4324861)
stress protein A-like protein	(LOC-Os4330472)
stress protein A-like protein	(LOC-Os4332595)
stress protein MT2085	(LOC-Os4352472)
stress protein MT2085	(LOC-Os4352472)
water stress-inducible protein Rab21-like	(LOC-Os4350448)

مشخص شده است در گندم نان به‌عنوان یک گیاه C3 تحت تنش خشکی MAP کینازها بیشترین بیان را در ریشه گیاه داشته است (Taheri and Alizade, 2004). در گیاه جو به‌عنوان یکی دیگر از گیاهان C3 وجود ژن‌هایی از دسته پروتئین کینازها همچون CIPK3 به‌عنوان عنصر تنظیمی مقاومت به خشکی گزارش شده است (Javadi and Shapar, 2015). در گیاه یونجه، MAP کیناز فعال شده بر اثر تنش موسوم به SAMK (که به آن MKK4 اثر تنش می‌شود) که به وسیله تماس و نیز سرما و خشکی فعال می‌شود (Bögre et al., 1996; Joank et al., 1996). اخیراً اثبات شده است که کاهش سیالیت غشای پلاسمایی عامل تحریک کننده‌ای است که منتج به فعال شدن SAMK می‌شود (Sangwan et al., 2002). این یافته نشان می‌دهد یکی از راه‌های احساس تنش خشکی، به واسطه تغییری که در سیالیت غشاء سلولی رخ می‌دهد، صورت می‌گیرد. در آرابییدوپسیس میزان MAP کینازهای ATMPK4 و ATMPK6 و mRNAهای متناظر آنها، پس از وقوع تنش بدون تغییر می‌ماند، ولی فعالیت این آنزیم‌های تحت تاثیر برخی تنش‌ها از جمله تنش کم‌آبی به سرعت افزایش می‌یابد (Ichimura et al., 2000). بنابراین به نظر می‌رسد که مسیر پیام‌دهی MAP کینازها، نقش

مشخص شده است در گندم نان به‌عنوان یک گیاه C3 تحت تنش خشکی MAP کینازها بیشترین بیان را در ریشه گیاه داشته است (Taheri and Alizade, 2004). در گیاه جو به‌عنوان یکی دیگر از گیاهان C3 وجود ژن‌هایی از دسته پروتئین کینازها همچون CIPK3 به‌عنوان عنصر تنظیمی مقاومت به خشکی گزارش شده است (Javadi and Shapar, 2015). در گیاه یونجه، MAP کیناز فعال شده بر اثر تنش موسوم به SAMK (که به آن MKK4 اثر تنش می‌شود) که به وسیله تماس و نیز سرما و خشکی فعال می‌شود (Bögre et al., 1996; Joank et al., 1996). اخیراً اثبات شده است که کاهش سیالیت غشای پلاسمایی عامل تحریک کننده‌ای است که منتج به فعال شدن SAMK می‌شود (Sangwan et al., 2002). این یافته نشان می‌دهد یکی از راه‌های احساس تنش خشکی، به واسطه تغییری که در سیالیت غشاء سلولی رخ می‌دهد، صورت می‌گیرد. در آرابییدوپسیس میزان MAP کینازهای ATMPK4 و ATMPK6 و mRNAهای متناظر آنها، پس از وقوع تنش بدون تغییر می‌ماند، ولی فعالیت این آنزیم‌های تحت تاثیر برخی تنش‌ها از جمله تنش کم‌آبی به سرعت افزایش می‌یابد (Ichimura et al., 2000). بنابراین به نظر می‌رسد که مسیر پیام‌دهی MAP کینازها، نقش

این مطالعه به ترتیب ۶۶۳ و ۱۵۸ ژن بطور مشترک در ژنوتیپ حساس و متحمل برنج و ذرت پس از تنش خشکی کاهش بیان معنی‌داری داشتند (شکل ۲-الف و ب). بیشترین کاهش بیان در هر دو گونه گیاهی مربوط به ژن‌های کدکننده ژن‌های درگیر در متابولیت ATP، ذرت (۸/۶- برابر) (LOC-LOC-Os) (Zm100285555) و برنج (۹/۳-) (LOC-Os9271802) (4349053) بود (جدول ۴). گروه‌های عملکردی شاخص در گیاه ذرت و برنج را نشان می‌دهد و برای نمایش تغییرات در تظاهر ژن‌ها، ژن‌های گروه‌های عملکردی به‌صورت Heatmap در شکل‌های ۳ و ۴ نمایش داده شده است. گروه‌بندی کارکردی ژن‌هایی که در هر دو گیاه در پاسخ به تنش افزایش بیان داشته‌اند در شکل ۵ نمایش داده شده است که در ذرت گروه کارکردی پروتئین‌های ریبوزومی دارای بیشترین تعداد ژن بودند در حالی که در برنج گروه‌های کارکردی اتصال فلز^۲، پاسخ به تنش، پاسخ به محرک‌های زیستی، انتقال پیام و پروتئین فسفاتازها بیشترین ژن‌ها را شامل شدند.

یکی از موضوعات جالب توجه در زمینه واکنش به تنش این بود که علاوه بر کینازها، فسفاتازها نیز جزء عوامل تغییردهنده ضروری در زنجیره‌های تنظیمی تنش می‌باشند (جدول ۴). فسفاتیدیک اسید (PA) به‌عنوان پیامبر ثانویه مهم که توسط فسفولیپاز (PLD) تولید شده بیان معنی‌داری در گیاه برنج نشان داده است. سیستم پیام‌دهی فسفولیپیدی در واکنش به برخی تنش‌ها خصوصاً تحت تنش خشکی در گیاهان به اثبات رسیده است (Munnik *et al.*, 2000). فعال شدن فسفولیپاز به تولید اسید فسفاتیدیک منجر می‌شود که به‌عنوان یک مولکول پیامبر ثانویه جهت فعال‌سازی اهداف پایین دست

مهمی در واکنش به تنش خشکی در سطح مولکولی ایفاء می‌کنند. همانگونه که ذکر گردید با توجه به آنالیز بررسی مقایسه‌ای بیان ژن‌ها (جدول ۳) در ژنوتیپ متحمل ذرت (به‌عنوان گیاه C4) بیشترین افزایش بیان مربوط به ژن‌های کدکننده پروتئین‌های شوک حرارتی بود. پروتئین‌های شوک حرارتی دارای نقش حفاظت سلولی هستند و می‌توانند در پاسخ به طیف وسیعی از محرک‌ها از قبیل گرما، خشکی، هیپوکسی، فلزات سنگین، تشعشعات و عفونت‌های ویروسی به‌وجود آیند این پاسخ در اثر برنامه‌ریزی مجدد تظاهر ژن انجام می‌گیرد که منجر به تغییرات متابولیکی در گیاه می‌شود (Heidarvand and Maali, 2010). پروتئین‌های شوک حرارتی در انتقال پیام تنش و فعال‌سازی ژن و همچنین در احیای سلولی نقش دارند و پس از درک مسیر تنش تولید پروتئین یا ترکیبات خاصی را به دنبال دارند که هومئوستازی را به حالت اول برمی‌گردانند یا وضعیت جدید هومئوستازی را در گیاه ایجاد می‌کنند (Shi *et al.*, 1998). این پروتئین در تنش خشکی از ماکرومولکول‌هایی مانند آنزیم‌ها و لیپیدها حمایت می‌نمایند (Shinozaki and Yamaguchi, 1999). همچنین بررسی پروتئین‌های شوک گرمایی در گوجه فرنگی و سبزی نشان می‌دهد این پروتئین نقش مهمی در حفاظت گیاهان در تنش سرما ایفاء می‌کند (Krishna and Gloor, 2001; Gallie *et al.*, 1995). در برگ‌های گیاه جو این پروتئین در اعمال تنش شوری افزایش بیان نشان داده است (Kotak *et al.*, 2007). در گیاه سویا به‌عنوان پاسخ دهنده به استرس O3 گزارش شده است (Moon *et al.*, 2014). نتایج حاصل از مقایسه ژنوتیپ‌های حساس نشان داد در هر دو گونه بیشترین افزایش بیان مربوط به ژن‌های اتصال لیپید^۱ بود. همچنین در

خشکی نشان داده در مسیرهای انتقال سیگنال محرک‌های محیطی به وسیله مولکول‌های گیرنده حس می‌گردند. برخی از سیگنال‌های کینازی ظاهراً خیلی زودتر از فسفاتازها در زنجیره سیگنال‌های موقتی عمل می‌نمایند، فسفوریلاسیون، مکانیسمی مؤثر و سریع برای تغییرات پس از ترجمه است که فعالیت فاکتورهای متصل شونده به DNA و عده‌ای از مولکول‌های حدواسط را تغییر می‌دهد. مقایسه نتایج حاصله از تحقیقات در زمینه MAP کینازها و فسفاتازها این فرضیه را پیشنهاد می‌نماید که MAP کینازها و احتمالاً سایر کینازها، سیگنال‌هایی صادر می‌کنند که متابولیسم سلولی را در جهت سنتز ترکیبات تقلیل دهنده و رفع کننده اثر تنش خشکی هدایت می‌کنند و نقش فسفاتازها تقویت این واکنش است (Kerk et al., 2002).

عمل می‌کند. سیگنال اسیدفسفاتیدیک به وسیله دو مسیر که فسفولیپاز C (PLC) و D (PLD) در آن‌ها شرکت دارند، ایجاد می‌شود. PLD سبب شکسته شدن فسفولیپیدها به گروهی با سر قطبی و نیز اسیدفسفاتیدیک‌ها می‌شود. مسیر دیگر پیام‌دهی فسفولیپیدی که در واکنش به تنش نقش دارد، مسیر فسفولیپاز C (PLC) می‌باشد. وظیفه PL، تبدیل فسفاتیدیل اینوزیتول ۴،۵-بی فسفات به اینوزیتول ۱،۴،۵-تری فسفات و دی اسیل گلیسرول می‌باشد. به نظر می‌رسد که PLC، مسیر وابسته به ABA را نیز فعال می‌نماید، زیرا بازدارنده‌های PLC از بیان ژن‌های هدفی که توسط تنش خشکی القاء می‌شوند، جلوگیری می‌کند. ژن‌های PLC القاء شونده توسط تنش خشکی، در گیاهان دیگر از جمله در سیب‌زمینی نیز شناسایی شده‌اند (Kopka et al., 1998). نقش متقابل کینازها و فسفاتازها در واکنش به تنش



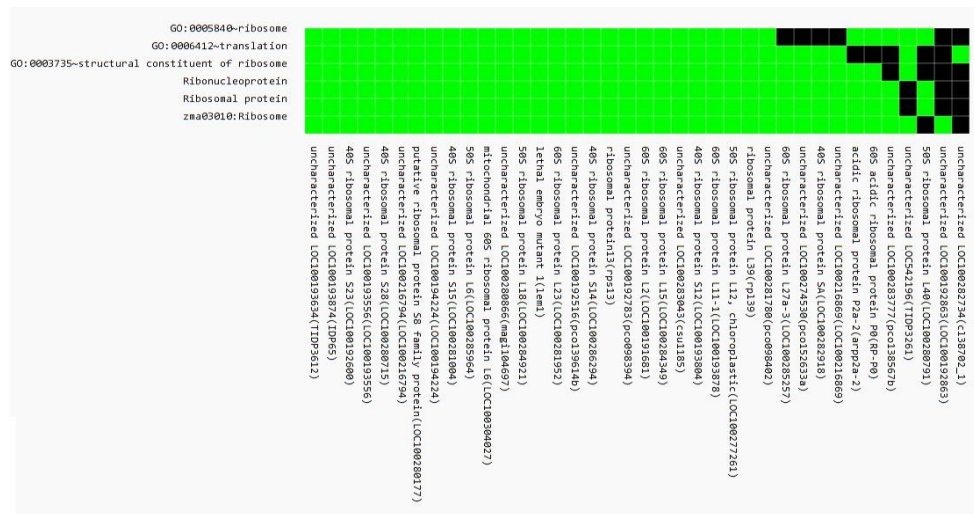
شکل ۳. Heatmap گروه‌های عملکردی در گیاه برنج

شناسایی شد. شناسایی گروه‌های کارکردی نشان داد که تغییرات کارکردی گیاهان C3 در پاسخ به تنش خشکی در جهت برقراری مجدد هومئوستازی گیاه و مقاومت در برابر تنش بوده است.

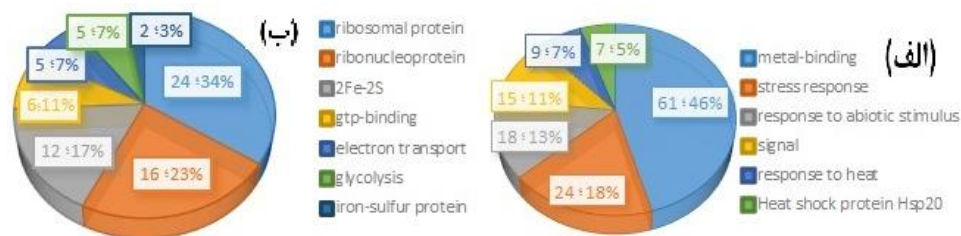
در این پژوهش تجزیه و تحلیل دقیق پروفایل بیان ژنی در ارقام حساس و متحمل به خشکی در گیاهان C3 و C4 به منظور شناسایی واکنش‌های گیاهی و صفاتی که از اهمیت بالایی در تحمل تنش هستند مورد بررسی قرار گرفت. به طور کلی به نظر می‌رسد که تغییر در بیان تعدادی از ژن‌ها در پاسخ به تنش خشکی به وقوع می‌پیوندد. در تأیید یافته ما، پاسخ گیاهان C4 حدود پنج برابر قوی‌تر از گیاهان C3 در برابر تنش خشکی است به همین دلیل گیاهانی که مسیر متابولیسمی آن‌ها C4 است، به آن‌ها اجازه بهره‌برداری از محیط‌های خشک را می‌دهد و دارای توان رقابتی بالاتری و سازگاری بیشتری به تنش خشکی در مقایسه با گیاهان C3 می‌باشند. این پژوهش از نظر گروه‌بندی ژن‌هایی که در تنش خشکی دچار تغییر می‌شوند، منحصر به فرد است. این گروه‌بندی بیان ژنی دارای ارزش پشتیبانی بالایی در تصمیم‌گیری برای اصلاح و تولید گیاهان مقاوم است. شبکه تنظیمی متفاوت در تنش خشکی در گیاهان C3 و C4 این زمینه را در مطالعه ما فراهم آورد تا با آنالیز مقایسه‌ای پروفایل بیان ژنی در ارقام حساس و متحمل این دو گونه گیاهی ژن‌های شاخص که در مقاومت به تنش سهم بسزایی دارند شناسایی شوند در این پژوهش گروه‌های کارکردی Stress response, Ribosomal protein و ژن‌های شاخص Heat shock protein, Chaperone protein در گیاه C4 و Protein phosphatase, Hexokinase در گیاه C3 و به‌عنوان ژن‌های مقاومت در برابر تنش شناسایی شد. گروه‌های کارکردی نشان داد که تغییرات کارکردی گیاهان C3 در پاسخ به تنش خشکی در جهت برقراری مجدد هومئوستازی گیاه و مقاومت در برابر تنش بوده است.

یکی دیگر از نتایج تنش خشکی افزایش غلظت واسطه‌های اکسیژن فعال^۱ می‌باشد واسطه‌های اکسیژن فعال سبب خسارت غیرقابل جبران به غشاءها، پروتئین‌ها، DNA و RNA می‌شوند البته غلظت پایین آن‌ها برای سلول ضروری است، زیرا برخی مولکول‌های ROI جزء ترکیبات ضروری در سیستم پیام‌دهی برای دفاع در برابر تنش می‌باشند (Mustilli et al., 2002). وقتی که غلظت ROI به دلیل وقوع خشکی افزایش می‌یابد، دفاع در برابر خسارت آن برای بقاء سلول ضروری است. انباشت ROI توسط سیستم‌های آنتی‌اکسیدانت داخلی کنترل می‌شود که شامل عوامل پالاینده آنزیمی، نظیر سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیدازها و کاتالازها می‌باشند. علاوه بر این استراتژی‌های عمومی دفاعی، به نظر می‌رسد که تنش خشکی سبب القای سایر آنزیم‌هایی که احتمالاً در تخریب دخالت دارند، نیز می‌شود. ایجاد تحمل به تنش در گیاه اغلب نتیجه‌ی مکانسیم‌های متعدد پاسخ به تنش است که در همکاری با یکدیگر، سلول را از خطرات حفظ کرده و به حفظ هومئوستازی سلولی کمک می‌کنند (Craita and Gerats, 2013; Osakabe et al., 2014). در این پژوهش تجزیه و تحلیل دقیق پروفایل بیان ژنی در ارقام حساس و متحمل به خشکی در گیاهان C3 و C4 به منظور شناسایی واکنش‌های گیاهی و صفاتی که از اهمیت بالایی در تحمل تنش هستند، مورد بررسی قرار گرفت به طور کلی پروفایل بیان ژنی گیاه برنج و ذرت نشان داد، سازگاری بعضی گیاهان مانند گیاهانی که مسیر متابولیسمی آنها C4 است، به آنها اجازه بهره‌برداری از محیط‌های خشک را می‌دهد. در این پژوهش ژن‌های شاخص heat shock protein chaperone protein در گیاه C4 و protein phosphatase, hexokinase در گیاه C3 به‌عنوان ژن‌های مقاومت در برابر تنش

1. Phosphoenolpyruvate carboxylase



شکل ۴. Heatmap گروه‌های عملکردی در گیاه ذرت



شکل ۵. گروه‌بندی کارکردی ژن‌های با افزایش بیان در پاسخ به تنش خشکی

(الف) در ژنوتیپ متحمل برنج (ب) در ژنوتیپ متحمل ذرت

جدول ۴. گروه‌های عملکردی شاخص در گیاه ذرت و برنج

Category	logFC	Adjusted P-value
<i>Functional groups in Oryza sativa</i>		
Stress response	10.1	3.0E-6
Heat shock factor (HSF)-type, DNA-binding	7.4	3.4E-4
response to heat	6.0	5.0E-5
response to abiotic stimulus	5.6	3.3 E-5
response to abscisic acid	5.3	3.8E-3
signal	4.3	8.6 E-4
HSP20-like chaperone	3.8	4.7E-5
Metal-binding	3.6	4.2E-2
response to water deprivation	3.3	4.9E-3
metal ion-binding site:Manganese 1; via carbonyl oxygen	2.2	8.9E-3
<i>Functional groups in Zea mays</i>		
Ribosomal protein	8.2	3.2E-8
Protein phosphatase	7.0	8.2E-4
Stress response	5.9	3.0E-6
2Fe-2S	4.6	5.9E-2
response to abscisic acid	4.0	6.8E-2
NAD	3.8	8.9E-2
Lyase	3.1	8.1E-2
Magnesium	2.7	4.5E-2
acid Dioxygenase	2.4	3.8E-3

REFERENCES

- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* 25: 25-29.
- Bögre L, Ligterink W, Heberle-bors E, Hirt H (1996) Mechanosensors in plants. *Nat.* 383: 489-490.
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995) Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell.* 7: 1099-1111.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics.* 19: 185-193.
- Bray EA (1993) Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103: 1035-1040.
- Chang C, Stewart RC (1998) The two-component system regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol.* 117: 723-731.
- Chaves MM (1991) Effects of Water Deficits on Carbon Assimilation. *J. Exp. Bot.* 42: 1-16.
- Chaves MM, Perira J (1992) Water stress, CO₂, and climate change. *J. Exp. Bot.* 43: 1131-1139.
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003) Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol.* 30: 239-264.
- Craita B, Gerats T (2013) Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Front Plant Sci.* 4: 273.
- Degenkolbe T, Do PT, Zuther E, Reipsilber D, Walther D, Hinch DK, Koehl KI (2009) Expression profiling of rice cultivars differing in their tolerance to long-term drought stress. *Plant Mol. Biol.* 69: 133-153.
- Edwards GE, Ku MSB (1987) Biochemistry of C₃-C₄ intermediates. In: Hatch M.D, Boardman NK (eds), *Biochemistry of Plants: Photosynthesis.* London: Academic Press. 10: 275-325.
- Epstein HE, Lauenroth WK, Burke IC, Coffin DP (1998) Regional productivities of plant species in the Great Plains of the United States. *Plant Ecol.* 134: 173-195.
- Gallie DR, Caldwell C, Pitto L (1995) Heat Shock Disrupts Cap and Poly (A) Tail Function during Translation and Increases mRNA Stability of Introduced Reporter mRNA. *Plant Physiol.* 108: 1703-1713.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 463-499.
- Heidarvand L, Maali Amiri R (2010) What Happens in Plant Molecular Responses to Cold Stress? *Acta Physiol. Plant.* 32: 419-431.
- Hura T, Hura K, Grzesiak M (2007) Effect of Long-term Drought Stress on Leaf Gas Exchange and Fluorescence Parameters in C₃ and C₄ Plants. *Acta Physiol. Plant.* 29: 103-113.
- Ichimura K, Mizoguchi T, Yoshida R, Yuasa T, Shinozaki K (2000) Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J.* 24: 655-65.
- Ingram J, Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 377-403.
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Kakimoto T (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nat.* 22: 1060-1073.
- Irizarry Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP (2003) Exploration,

- normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 4: 249-64.
- Javadi S, Shapar ZS, Pourabed E, Ghadiri S (2015) Reconstruction of gene networks involved in response to drought stress in the leaves tissue of barley. Available at <http://biotechcongress.ir/>, Tehran, Iran.
- Jonak C, Kiegeri S, Ligterink W, Barker PJ, Huskisson NS, Hirt H (1996) Stress signaling in plants: a mitogen-activated by cold and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 20: 11274-11279.
- Kerk D, Bulgrien J, Smith DW, Barsam B, Veretnik S, Gribskov M (2002) The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129: 908-25.
- Kopka J, Pical C, Gray JE, Muller-Rober B (1998) Molecular and enzymatic characterization of three phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms from potato. *Plant Physiol.* 116: 239-50.
- Kotak S, Larkindale J, Lee Ung, Koskull-Doering P, von Vierling E, Scharf KD (2007) Complexity of the heat stress response in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 310-316.
- Krishna P, Gloor G (2001) The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones* 6: 238-246.
- Lee BH, Henderson DA, Zhu JK (2005) The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell.* 17:3155-3175.
- Maclean JL, Hettle GP (Eds) (2002). *Rice almanac: Source book for the most important economic activity on earth.* 3rd Ed. Int. Rice Res. Inst. CABI. pp 253.
- Moon J-C, Yim WC, Lim SD, Song K, Lee B-M (2014) Differentially expressed genes and in silico analysis in response to ozone (O₃) stress of soybean leaves. *Aust. J. Crop Sci.* 8: 276-283.
- Mott IW, Wang RRC (2007) Comparative transcriptome analysis of salt-tolerant wheat germplasm lines using wheat genome arrays. *Plant Sci.* 173: 327-339.
- Munnik T, Meijer HJ, Ter Riet B, Hirt H, Frank W, Bartels D, Musgrave A (2000) Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant J.* 22: 147-54.
- Mustilli A-C, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J (2002) *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell.* 14: 3089-3099.
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiol.* 149: 88-95.
- Nayyar H (2003) Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stressed wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists. *Environ. J. Exp. Bot.* 50: 253-264.
- Nelson DM, Sheng Hu F, Tian J, Stefanova I, Brown TA (2004) Response of C3 and C4 plants to middle-Holocene climatic variation near the prairie-forest ecotone of Minnesota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 13: 562-567.
- Neves SR, Ram PT, Iyengar R (2002) G protein pathways. *Science.* 296: 1636-9.
- Nocter G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *J. Exp. Bot.* 53: 1283-1304.
- Osakabe K, Shinozaki S, Tran LS.P, (2014) Response of plants to water

- stress. *Front. Plant Sci.* 5: 86.
- Pierce M, Raschke K, (1980) Correlation between loss of turgor and accumulation of abscisic acid in detached leaves. *Planta.* 148: 174-18.
- Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E (2010) ABA perception and signaling. *Trends Plant Sci.* 15: 395-401.
- Rock C (2000) Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol.* 148: 357-396.
- Sangwan V, Orvar BL, Beyerly J, Hirt H, Dhindsa RS (2002) Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant J.* 31: 629-638.
- Shi Y, Mosser DD, Morimoto RI (1998) Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.* 12: 654-666.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115: 327-334.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1999) In molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants. *Science.* pp 170.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 410-417.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58: 221-227.
- Simpson S D, Nakashima K, Narusakam Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J.* 33: 259-270.
- Taheri H, Alizade H, Naghavi MR, Seafi AR (2004) MAPKs expression pattern under drought stress in bread wheat. *Trends Biochem. Sci.* 22: 172-176.
- Walia H, Wilson C, Condamine P, Liu X, Ismail AM, Zeng L, Wanamaker SI, Mandal J, Xu J, Cui X, Close TJ (2005) Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage. *Plant Physiol.* 139: 822-835.
- Ward JK, Tissue DT, Thomas RB, Strain BR (1999) Comparative responses of model C3 and C4 plants to drought in low and elevated CO₂. *Global Change Biol.* 5: 857-867.
- Wurgler-Murphy SM, Saito S (1997) Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem. Sci.* 22: 172-176.
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell.* 14: 165-183.
- Zali H, Taverani MR, Salemian J, Aulad J, Bastami-nejhad S (2013) The network for the analysis of gene expression microarray data of DNA. *J. Med. Sci.* 20: 150-138.
- Zheng J, Fu J, Gou M, Huai J, Liu Y, Jian M, Huang Q, Guo X, Dong Z, Wang H, Wang G (2010) Genome-wide transcriptome analysis of two maize inbred lines under drought stress. *Plant Mol. Biol.* 72: 407-421.