

«مقاله پژوهشی»

آنالیز شبکه هم‌بیانی ترانسکریپتوم لوبیا به منظور شناسایی ماژول‌ها و ژن‌های هاب درگیر در مقاومت به کنه تارتن دولکه‌ای

فاطمه محمدی^۱، ابوزر سورنی^{۲*}، رحیم مهرابی^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌فناوری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

۲. استادیار، گروه زیست‌فناوری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

۳. دانشیار، گروه زیست‌فناوری، دانشکده مهندسی کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۳۰)

Co-expression network analysis of common bean transcriptome in order to identify modules and hub genes involved in resistance to *Tetranychus urticae* (Acari, Tetranychidae)

Fatemeh Mohammadi¹, Abozar Soorni^{2*}, Rahim Mehrabi³

1. M.Sc. Student, Department of Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

3. Associate Professor, Department of Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

(Received: Sep. 21, 2022 - Accepted: May 30, 2022)

Abstract

Two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) is one of the most important pests of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Since, complex gene networks are involved in creating sensitivity or resistance against the two-spotted spider mite; therefore, in this research we used biological system methods to identify key networks. For this purpose, we used the RNA-Seq data related to the two-spotted spider mite stress on common bean plant. After providing the gene expression matrix, molecular networks were analyzed using weighted co-expression network analysis (WGCNA). After the modules identification, the gene functions in each module were investigated and analyzed. According to the results, a total of 699 genes were identified with differential expression in response to two-spotted spider mite stress, which were placed in 7 co-expression modules through hierarchical clustering. Gene ontology and interaction analysis of key genes using the String database showed that the response of common bean transcriptome to two-spotted spider mite infestation includes genes encoding protein kinases, catalysts, transcription factors, and metabolite production and pathways of hormonal message transmission. It is notable that among the most important genes that showed co-expression, WRKY and lipoxygenase were highlighted. The turquoise module had the higher number of genes involved in resistance, and this module and the yellow module had the highest correlation with the resistant variety after five and one day of contamination, respectively. Also, the black module had the highest correlation with the sensitive variety after five days of contamination. In conclusion, this study increases our knowledge of the molecular mechanisms involved in resistance to the two-spotted spider mite. Also, the genes examined in this research can be introduced as breeding targets to create resistance.

Keywords: co-expression network, Common bean, gene interaction, transcriptome, two spotted spider mite

چکیده

کنه تارتن دولکه‌ای (*Tetranychus urticae* Koch) از مهم‌ترین آفات تخریب‌کننده لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) است. به‌طور کلی شبکه‌های ژنی پیچیده‌ای در ایجاد حساسیت یا مقاومت در مقابل کنه تارتن دولکه‌ای دخیل هستند، بنابراین در این تحقیق از روش سامانه‌های زیستی به‌کار برده شد. برای این منظور از داده‌های RNA-Seq مربوط به تنش کنه تارتن روی گیاه لوبیا استفاده شد. پس از فراهم کردن ماتریس بیان ژن‌ها، شبکه‌های مولکولی با استفاده از آنالیز شبکه هم‌بیان وزندار (WGCNA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. پس از ایجاد ماژول‌ها، عملکرد ژن‌ها در هر ماژول مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بر اساس نتایج، مجموع ۶۹۹ ژن با بیان افتراقی در پاسخ به تنش کنه تارتن شناسایی شدند که در ۷ ماژول هم‌بیان از طریق خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی جای گرفتند. بررسی هستی‌شناسی ژن‌ها و آنالیز برهمکنش ژن‌های کلیدی با استفاده از بانک اطلاعاتی String نشان داد پاسخ ترانسکریپتوم لوبیا به آلودگی با کنه تارتن بیشتر شامل ژن‌های کدکننده پروتئین کینازها، کاتالیزورها، فاکتورهای رونویسی، ساخت متابولیت‌ها و مسیرهای انتقال پیام هورمونی بود. ماژول فیروزه‌ای بیشترین ژن‌های درگیر در مقاومت را دارا بود که این ماژول و ماژول زرد، بیشترین همبستگی را با رقم مقاوم به ترتیب پس از پنج و یک روز آلودگی داشتند. همچنین، ماژول مشکی بیشترین همبستگی با رقم حساس پس از پنج روز آلودگی را داشت. این مطالعه دانش ما را از مکانیسم‌های مولکولی دخیل در مقاومت به کنه تارتن افزایش می‌دهد. همچنین ژن‌های بررسی شده در این تحقیق می‌توانند به‌عنوان اهداف اصلاحی برای ایجاد مقاومت معرفی شوند.

واژه‌های کلیدی: برهمکنش ژن‌ها، ترانسکریپتوم، شبکه هم‌بیانی، لوبیا، کنه تارتن دولکه‌ای.

مقدمه

لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) یکی از مهم‌ترین منابع غذایی در جهان است. که حدود ۵۰ درصد از حبوبات مصرفی انسان را فراهم می‌کند (Broughton et al., 2003). به دلیل محتوای بالای مواد مغذی و پتانسیل تجاری، لوبیا نویدبخش مبارزه با گرسنگی و افزایش درآمد است (Katungi et al., 2010). وجود کنه تارتن دولکه‌ای (*Tetranychus urticae* Koch) از جمله جدی‌ترین مشکلات لوبیا است که هر ساله زیان‌های جبران ناپذیری به کشاورزان وارد می‌کند و برای غلبه بر این آفت هزینه زیادی صرف می‌شود. کنه تارتن دولکه‌ای به دلایلی چون ایجاد خسارت زیاد به گیاه، دامنه وسیع میزبانی، پتانسیل بالای رشد جمعیت و توانایی ایجاد مقاومت نسبت به آفت‌کش‌ها اهمیت دارد. کنه‌ها از اولین آفات گلخانه‌ای هستند که به آفت‌کش‌ها مقاومت نشان دادند و همچنین سرعت تولیدمثل بالایی دارند. این خصوصیات، امروزه کنه‌های تارتن را به آفتی پرخطر و کاهش‌دهنده کیفیت و کمیت محصولات گیاهی تبدیل کرده است (Kavousi, 2000). به دلیل کند بودن شکستن مقاومت میزبان به واسطه کنه‌ها، در صورتی که این مقاومت توسط دشمنان طبیعی کنه نیز یاری شود، بهترین روش جهت کنترل جمعیت کنه کشت گیاهان مقاوم خواهد بود. در واقع چون کنه‌های تارتن دولکه‌ای چندگونه‌خوارند، چالش‌های بسیاری در شروع مدیریت کنه‌ها با تکیه بر مقاومت میزبان وجود دارد و شناسایی نوع و مکانیسم مقاومت اولین چالش است (Onstad & Knolhoff, 2014).

نتایج پژوهش‌های مولکولی به‌ویژه بررسی بیان ژن‌های دفاعی در زمان تنش توانسته اطلاعات مربوط به مکانیسم مقاومت به بیمارگرها و تحمل را افزایش داده و سبب هموارتر شدن روش‌های بیوتکنولوژی برای تولید ارقام متحمل شود. با وجود پیشرفت‌های شگرف در تعیین توالی ژنوم گیاهان، هنوز در مورد نحوه عمل برخی ژن‌ها همچنان اطلاعات اندکی وجود دارد. امروزه

ابداع روش‌های جدید با کارایی بالا امکان بررسی بیان هزاران ژن را به‌طور هم‌زمان فراهم کرده است. در واقع با تجزیه و تحلیل چنین داده‌هایی می‌توان به حجم بیشتری از اطلاعات درباره سیستم‌های زیستی دست یافت (Schaefer et al., 2017). در این میان یکی از مسائل کلیدی در درک رفتار سلولی کشف فعل و انفعالات بین ژن‌ها است که به کمک استخراج شبکه‌های ژنی ارتباط بین ژن‌ها کشف می‌شود. شبکه‌های ژنی مجموعه‌ای از ژن‌ها می‌باشند که در سلول به‌صورت غیرمستقیم با هم تعامل دارند (Niemi, 2007). یکی از راهکارهای مرسوم در زیست‌شناسی سامانه‌ها بررسی ارتباطات بین ژن‌ها می‌باشد، از جمله این روش‌ها به شبکه‌های هم‌بیان ژنی می‌توان اشاره کرد (Serin et al., 2016). در این شبکه‌ها ژن‌ها در صورتی با هم در ارتباط هستند که پروفایل بیانی آن‌ها در پاسخ به شرایط بیرونی و درونی سلول به‌صورت هم‌زمان تغییر کند (Zhang & Horvath, 2005). از جمله تکنیک‌هایی که برای مدل‌سازی شبکه‌های تنظیمی ژنی استفاده می‌شود خوشه‌بندی داده‌ها می‌باشد که برای خوشه‌بندی داده‌ها از اطلاعات بیولوژیکی موجود در ژن‌ها استفاده می‌شود (Shih et al., 2004). در شبکه‌های هم‌بیان وزن‌دار (WGCNA)^۱، پس از ایجاد شبکه، ژن‌ها را درون گروه‌های مجزا (ماژول) قرار می‌دهد. ماژول‌ها تحت عنوان خوشه‌ای از ژن‌ها تعریف می‌شوند که پروفایل بیانی آن‌ها به شدت با یکدیگر همبستگی دارند (Bergmann et al., 2004). در روش شبکه‌های هم‌بیان وزن‌دار، هر ماژول هم‌بیان می‌تواند بازتاب‌دهنده یک پیام زیستی حقیقی باشد. برای بررسی معنی‌دار یک ماژول از نظر زیستی از تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن (GO) می‌توان استفاده کرد (Langfelder & Horvath, 2008).

1. Weighted Gene Co-expression Network Analysis

تکراری غنی از لوسین (NLR)، پروتئین‌های شوک حرارتی و فاکتورهای رونویسی WRKY، به‌طور متفاوتی در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس بیان شدند (Jain et al., 2016). با استفاده از فناوری RNA-Seq الگوی بیان ژن از نمونه‌های گیاهی لوبیا تحت ۳ تیمار نیتروژن اندازه‌گیری شد. الگوهای بیان ژن در همه نمونه‌ها برای درک بهتر تغییرات ناشی از گره‌زایی، رشد بذری و استفاده از نیتروژن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ۲۶ خانواده فاکتور رونویسی تفاوت بیان بر اساس نوع بافت داشتند، از جمله آن‌ها می‌توان WRKY، SBP، NAC، MYB و HSF را نام برد (O'Rourke et al., 2014). جهت بررسی ارتباطات میان ژن‌های درگیر در تنش خشکی در انگور (Hopper et al., 2016) و پیری برگ‌ها در آفتابگردان (Moschen et al., 2016) از شبکه‌های هم‌بیان وزن‌دار استفاده شد.

روش‌شناسی پژوهش

در ابتدا اطلاعات ترانسکریپتومی دو رقم حساس و مقاوم لوبیا تحت تنش کنه تارتن دولک‌های از بانک اطلاعاتی NCBI به شماره دسترسی PRJNA482175 دریافت گردید. کنترل کیفیت توالی‌ها شامل کیمیت و کیفیت خوانش‌ها و همچنین بررسی حضور آلودگی‌های آداپتوری با استفاده از نرم‌افزار FastQC (بر اساس الگوریتم فراخوانی باز و سیستم نمره‌دهی فرد) انجام شد. جهت پیرایش توالی‌ها از نرم‌افزار Trimmomatic استفاده شد (Bolger et al., 2014). با استفاده از این ابزار، توالی‌های با کیفیت پایین (کمتر از ۳۰)، طول کوتاهتر از ۵۰ نوکلئوتید، و توالی‌های آداپتوری حذف شدند. توالی‌های ژنوم مرجع لوبیا نسخه ۲ از سایت <https://legumeinfo.org> و کنه تارتن دولک‌های نسخه ۲ (Grbić et al., 2011) دریافت شد. فایل‌های مستند ژنوم لوبیا با فرمت GTF از سایت

در این مطالعه از آنالیز RNA-Seq برای تشخیص تفاوت در بیان ژن بین دو رقم لوبیا (ناز و اختر) و تعیین ژن‌ها و مسیرهای موثر در پاسخ به آلودگی کنه تارتن استفاده کردیم. چنین اطلاعاتی می‌تواند منجر به شناسایی مکانیسم‌ها و ژن‌های مقاوم در لوبیا شود و تلاش‌های اصلاحی را با شناسایی نشانگرهای مولکولی برای ترکیب مقاومت در انواع لوبیاهای تجاری بهبود بخشد.

پیشینه پژوهش

کمبود اطلاعات در مورد نحوه تعامل گیاه و کنه بر اهمیت یک مطالعه جامع از برهمکنش‌های مولکولی بین لوبیا و کنه تارتن دولک‌های برای درک مکانیسم‌ها و مسیرهای بیولوژیکی بالقوه مقاومت در برابر لوبیا تأکید می‌کند. اگرچه از RNA-Seq برای بررسی نمایه‌های بیان ژن‌های پاسخ به تنش در گیاهان مدل و غیرمدل استفاده شده است، اما هیچ مطالعه‌ای در مورد تغییرات رونوشت لوبیا ناشی از تغذیه کنه‌های دولک‌های انجام نشده است. در مطالعه‌ای داده‌های ریزآرایه مربوط به گیاه آراییدوپسیس برای آنالیز شبکه هم‌بیانی مورد استفاده قرار گرفت، از تجزیه و تحلیل آن‌ها با روش شبکه هم‌بیانی ژنی وزن‌دار، ۲۵ گروه ژنی به‌دست آمد که پروفایل بیانی آن‌ها در پاسخ به جاسمونیک‌اسید با یکدیگر دارای همبستگی معنی‌دار بالایی بود. نتایج نشان داد که فرآیندهای زیادی از جمله فتوسنتز، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و پاسخ به تنش‌های مختلف به‌وسیله جاسمونات کنترل شدند. علاوه بر این، تعداد زیادی عامل رونویسی در تنظیم پاسخ‌های جاسمونیک‌اسید نقش داشتند و فرآیندهایی چون پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، نمو گل و پاسخ به نور را کنترل نمودند (Mortezaeefar et al., 2017). پروفایل بیان ژن ریشه دو ژنوتیپ لوبیا چیتی تحت تیمار نماتد کیست سویا (CSN) با استفاده از NGS بررسی شد. ژن‌های کدکننده پروتئین‌های مقاومت

یافته‌های پژوهش

داده‌های ترانسکریپتوم لوبیا که از برگ‌های رقم اختر (حساس) و رقم ناز (مقاوم) آلوده به کنه تارتن و گیاه سالم تحت عنوان شاهد در دوره زمانی یک روز و پنج روز پس از آلودگی به‌دست آمده بودند، از لحاظ کیفی بررسی، و خوانش‌هایی که از کیفیت پایینی برخوردار بودند حذف شدند. از ۱۷۳۴۱۲۸۴۵ خوانش اولیه حدود ۲۹ درصد در نتیجه پیرایش حذف شد و تعداد ۱۲۳۹۴۳۴۵۵ خوانش دارای کیفیت مطلوبی بودند که برای آنالیزهای بعدی مورداستفاده قرار گرفتند. خوانش‌های مطلوب حاصل از کنترل کیفیت با ژنوم لوبیا هم‌مدیف شدند. بیشتر از ۹۰ درصد خوانش‌ها با ژنوم مرجع منطبق شدند. همچنین این خوانش‌ها با ژنوم مرجع کنه نیز هم‌مدیف شدند که میزان انطباق آن کمتر از ۰/۱ درصد بود، این انطباق کم نشان دهنده آلوده نبودن نمونه‌های RNA توالی‌یابی شده است.

جهت تعیین سطح بیان ژن‌ها و تجزیه و تحلیل ژن‌هایی که تغییر بیان داشتند، سطح بیان خوانش‌های هم‌مدیف‌شده به‌صورت FPKM محاسبه شدند و سپس تفاوت بیان ژن‌ها در تمام مقایسات در سطح $FDR \leq 0/01$ مورد بررسی قرار گرفتند. غیر از مقایسه روز پنجم پس از آلودگی در رقم ناز نسبت به اختر که بررسی آن در سطح $FDR \leq 0/05$ انجام شد. کاهش سطح معنی‌داری در این مقایسه به‌علت نبود تفاوت بیان معنی‌دار در سطح $FDR \leq 0/01$ بود. از مقایسات فوق در مجموع ۶۹۹ ژن منحصربه‌فرد با بیان متفاوت شناسایی شد که از آن‌ها برای آنالیز ساخت شبکه استفاده شد.

به‌منظور شناسایی ماژول‌ها از شاخص برآزش توپولوژیکی بدون مقیاس استفاده شد. در این مسیر مقدار آستانه نرم برابر با ۰/۶ به‌دست آمد که از سطح معنی‌دار ۰/۸ پایین‌تر بود. به همین دلیل از جدول ثابت برای انتخاب آستانه نرم استفاده شد. طبق جدول ثابت برای تعداد نمونه زیر ۲۰ عدد، مقدار عددی ۹ به‌عنوان آستانه نرم در نظر گرفته شد. به‌واسطه شناسایی

دریافت شد. هم‌مدیفی <https://legumeinfo.org> قرائت‌ها با استفاده از نرم‌افزار STAR ورژن ۲.۶.۱ (Dobin et al., 2013) به ژنوم مرجع کنه تارتن دولکه‌ای و لوبیا انجام شد. اجرای این ابزار در محیط لینوکس و با استفاده از خطوط فرمان این ابزار انجام شد. شناسایی ترانسکریپتوم‌ها و میزان بیان آن‌ها به کمک فایل‌های bam فراهم شده توسط ابزار STAR با استفاده از پکیج Cufflinks صورت گرفت. یک فایل GTF مرجع با استفاده از نرم‌افزار Cuffmerge از طریق ادغام فایل‌های GTF حاصل از مرحله قبل ایجاد شد. ژن‌های با بیان افتراق معنی‌دار (DEGs) (بیان بزرگتر از ۲ و $FPKM > 2$) و تفاوت آماری در سطح $FDR \leq 0/05$ و $FDR \leq 0/01$ به‌عنوان سطوح معنی‌داری) با نرم‌افزار Cuffdiff شناسایی شدند. جهت شناسایی ماژول‌ها و ساخت شبکه‌های هم‌بیانی از پکیج WGCNA در نرم‌افزار R استفاده شد. برای این منظور از ماتریس بیان ژن تمام نمونه‌ها استفاده شد. برای تابعیت شبکه از توپولوژی بدون مقیاس یک آستانه نرم در پکیج WGCNA تعیین شد. از مقیاس هم‌پوشانی توپولوژیکی به‌عنوان مقیاسی از اتصالات شبکه استفاده شد (Langfelder & Horvath, 2008). بعد از ایجاد ماتریس هم‌پوشانی توپولوژیکی (TOM)، از عدم شباهت متناظر برای کاهش ارتباطات نادرست استفاده شد. در این پژوهش از روش خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی استفاده شد. از ماتریس عدم تشابه (1-TOM) استفاده شد و ماژول‌ها در دندروگرام از طریق الگوریتم برش درخت هیبرید دینامیک شناسایی شدند و در نهایت وضعیت امکان ادغام ماژول‌ها نیز بررسی شد. پروفایل بیان ژن برای هر ماژول توسط eigengenes خلاصه شد. برای بیان ویژگی‌های ژن‌ها و محصولات ژنتیکی و ارائه اطلاعاتی ساختار یافته و قابل پردازش از عملکرد ژن‌ها و محصولات ژنتیکی برای هر یک از ماژول‌ها، هستی‌شناسی ژن (GO)، با استفاده از وبسایت WEGO انجام شد.

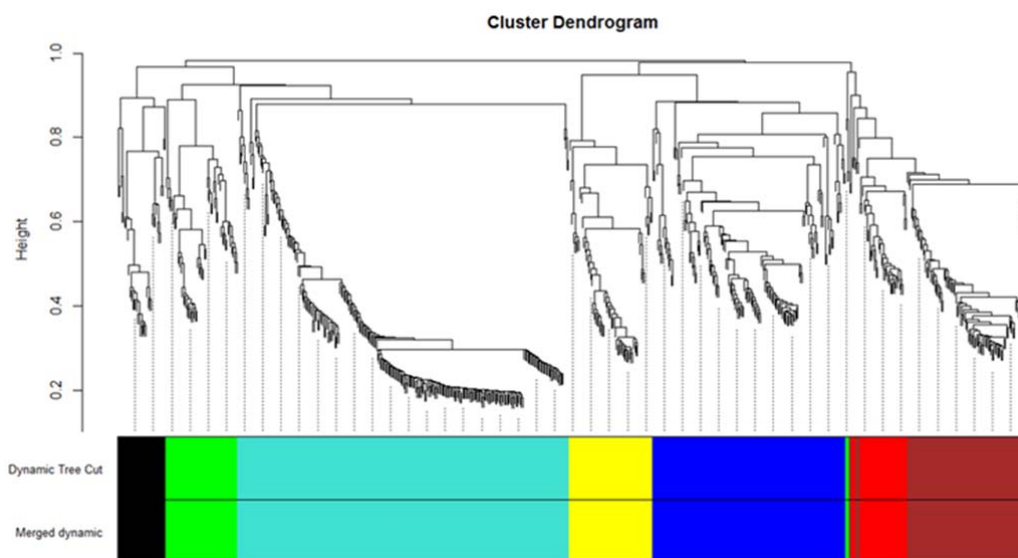
مختلف تحت تنش با کنه، آنالیز همبستگی با استفاده از مجموعه ابزار WGCNA انجام شد. نتایج این همبستگی نشان داد که بیشترین میزان همبستگی ماژول زرد با تیمار روز اول رقم مقاوم، بیشترین میزان همبستگی ماژول فیروزه‌ای با رقم مقاوم در تیمار روز پنجم و بیشترین میزان همبستگی ماژول مشکی با تیمار روز پنجم رقم حساس بود. لازم به ذکر است کمترین میزان همبستگی مربوط به ماژول قرمز با رقم مقاوم در تیمار روز نخست بود (شکل ۲).

ماژول مشکی

بررسی نقش و عملکرد ژن‌های موجود در این ماژول نشان داد بیشتر ژن‌ها به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم در دفاع از گیاه نقش داشتند. ژن‌های این ماژول در رقم مقاوم به تدریج بعد از تیمار با کنه افزایش بیان داشتند، به‌طور مشابه در رقم حساس با گذشت زمان بیان این ژن‌ها بیشتر شد، اما بیشترین میزان بیان مربوط به تیمار روز پنجم در گیاه حساس بود (شکل ۳-الف). بیشترین تعداد ژن‌های این ماژول کاتالیزورها بودند که مهم‌ترین آن‌ها لیپوکسیژنازها می‌باشند (شکل ۴-الف).

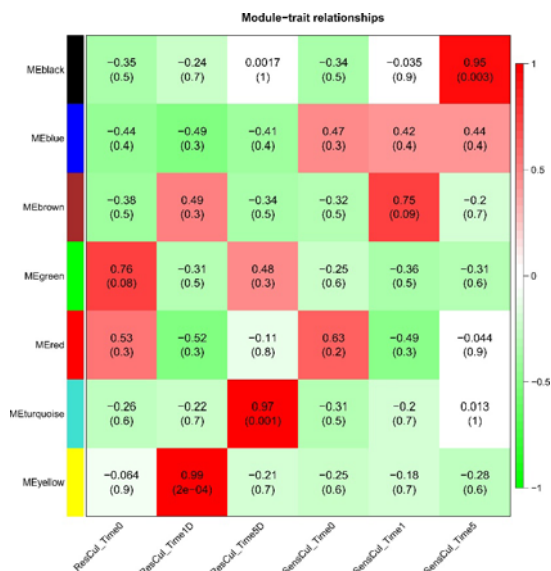
ماژول‌ها با استفاده از dynamic tree cut ۶۹۹ ژن در ۷ ماژول هم‌بینی از طریق خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی جای گرفتند. به‌منظور شناسایی ماژول‌ها، کمترین تعداد ژن در ماژول، ۳۰ در نظر گرفته شد. ماژول ۱ (فیروزه‌ای) شامل ۲۵۴ ژن، ماژول ۲ (آبی) شامل ۱۴۸ ژن، ماژول ۳ (قهوه‌ای) شامل ۹۹ ژن، ماژول ۴ (زرد) شامل ۶۴ ژن، ماژول ۵ (سبز) شامل ۵۸ ژن، ماژول ۶ (قرمز) شامل ۳۹ ژن و ماژول ۷ (مشکی) شامل ۳۷ ژن بود (شکل ۱).

نتایج بررسی همبستگی ماژول‌ها نشان داد که ماژول فیروزه‌ای بیشترین همبستگی را با دیگر ماژول‌های به‌دست آمده از آنالیز شبکه هم‌بینی داشت. وجود بالاترین تعداد ژن در این ماژول می‌تواند مهم‌ترین عامل ایجاد این نوع همبستگی باشد. بررسی دقیق‌تر ارتباط میان ماژول‌ها، نشان داد که ۷ ماژول حاصل می‌توانند در سه دسته اصلی گروه‌بندی شوند. بر اساس نتایج، ماژول‌های مشکی-آبی، زرد-قهوه‌ای و قرمز-فیروزه‌ای-سبز با یکدیگر همبستگی داشتند. به‌منظور بررسی و ارزیابی همبستگی میان ماژول‌ها و ارقام در زمان‌های

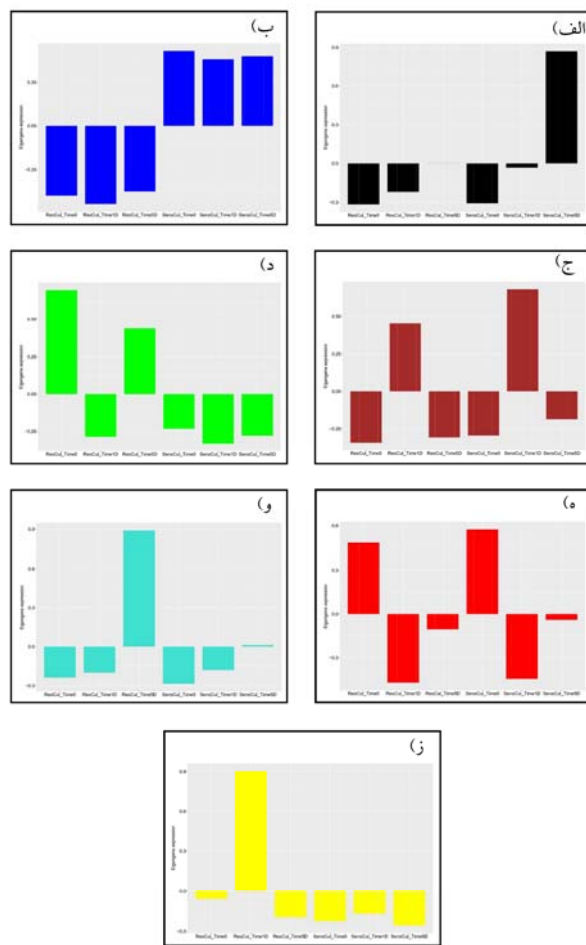


شکل ۱. شناسایی ماژول‌های هم‌بینی با استفاده از روش خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی.

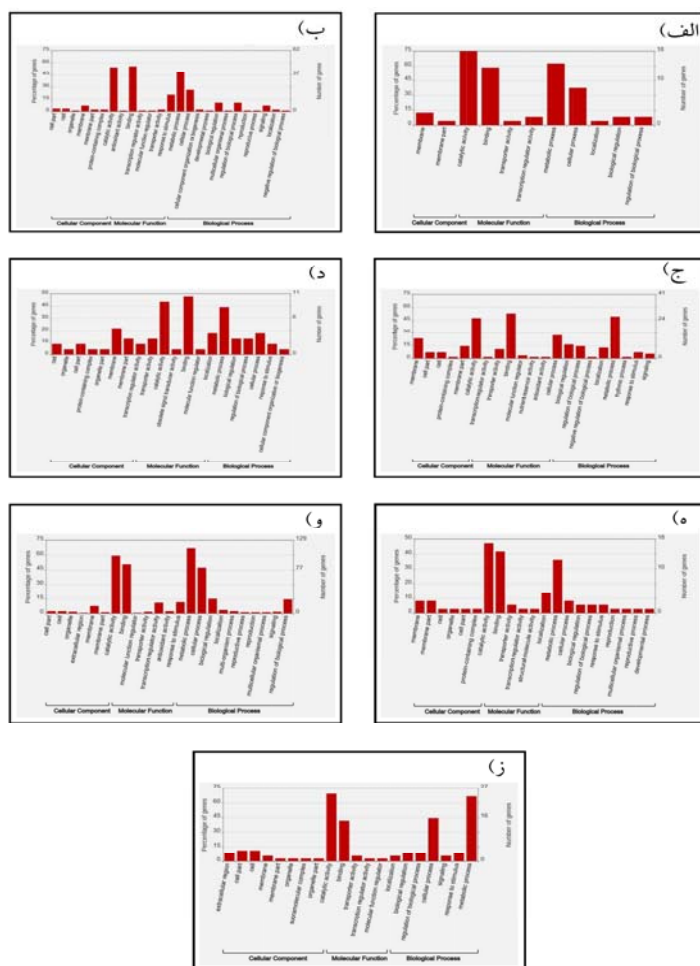
محور X ژن‌ها و محور Y فاصله هم‌بینی را نشان می‌دهند، در این شکل هر رنگ نشان‌دهنده یک ماژول است.



شکل ۲. همبستگی ماژول‌ها با صفت. هر ردیف مربوط به یک خوشه است و هر ستون مربوط به یک نمونه. پانل سمت چپ ۷ ماژول را نشان می‌دهد و پانل سمت راست یک مقیاس رنگی برای همبستگی صفت و ماژول از -۱ تا ۱ است.



شکل ۳. الگوی بیان ژن‌های ماژول‌ها در نمونه‌های مختلف.



شکل ۴. آنالیز GO ماژول‌های مختلف.

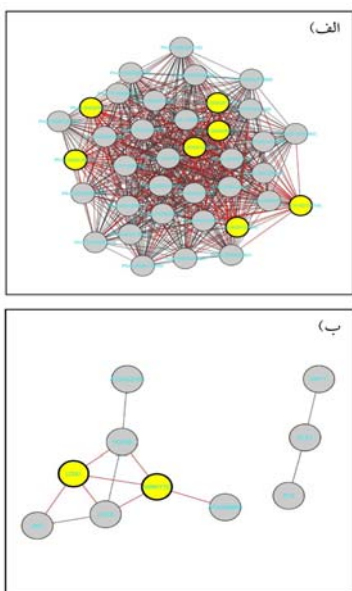
آهن هستند که اکسیژناسیون سیدهای چرب غیراشباع را کاتالیز می‌کنند. مسیر متابولیسم لیپوکسیژناز در سنتز مولکول‌های نظارتی مانند آبسیزیک‌اسید، تروماتیک‌اسید و جاسمونیک‌اسید نقش دارد (Creelman et al., 1992). شبه‌گیرنده‌های کینازی غنی از لوسین^۳ (RLK)، کینازهایی هستند که نقش بسیار حیاتی در بروز پاسخ‌های ایمنی گیاه بر عهده دارند (Heese et al., 2007). نقش کینازها در القای مقاومت به گیاه در نتیجه حمله آفات و بیماری‌های گیاهی به روشنی قابل‌درک است.

از مهم‌ترین ژن‌های این ماژول می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:
 پروتئین‌های WRKY^۱ که بازیگران اساسی در شبکه سیگنالینگ کیناز هستند. بخش بزرگی از ژن‌های WRKY به عوامل بیماری‌زا، الیستورها و هورمون‌های گیاهی مرتبط با دفاع مانند سالیسیلیک‌اسید (SA) یا جاسمونیک‌اسید (JA) پاسخ می‌دهند که این امر نقش مهمی برای خانواده ژن‌های WRKY در ایمنی گیاهان دارد (Jones & Dangl, 2006). لیپوکسیژنازها^۲، یک گروه از آنزیم‌های حاوی

3. Leucine-rich repeat protein kinase family protein

1. WRKY family transcription factor
 2. Lipoxigenase

از جمله پاسخ فوق حساسیت می‌شود که رشد پاتوژن را محدود می‌کند. دی‌آسیل‌گلیسرول کیناز که دومین پیام‌رسان دی‌آسیل‌گلیسرول (DAG) را برای تولید اسیدفسفاتیدیک (PA) که مولکول سیگنالینگ مهمی است فسفریله می‌کند. برای رشد گیاه و پاسخ به استرس غیرزنده و حمله پاتوژن مورد نیاز است و ممکن است در تجمع PA در طول تنش سرما نیز نقش داشته باشد.



شکل ۵. الف) نمایش شبکه‌ای ارتباط ژن‌های ماژول مشکی در cytoscape. ب) شبکه ژنی پیش‌بینی شده ماژول مشکی، رسم‌شده در سایت String. خطوط رسم‌شده بین ژن‌ها نشان‌دهنده ارتباط میان ژن‌ها می‌باشد.

بر اساس نتایج حاصل از برهمکنش ژن‌ها در شبکه String، بیشترین احتمال برهمکنش مربوط به ژن‌های DNA-directed DNA polymerases و DNA ligase 1 بود. در کل شبکه هم‌بیانی ماژول آبی، شبکه‌ای پیچیده و شامل ۱۰۱۴۲ برهمکنش بود. بیشترین برهمکنش‌ها در ژن کدکننده پروتئین TIR-NBS-LRR با ۱۲۶ برهمکنش و ژن کدکننده پروتئین حاوی دامنه NB-ARC با ۱۲۵ برهمکنش بود (شکل ۶-الف).

بر اساس بررسی برهمکنش ژن‌ها با استفاده از اطلاعات عملکردی موجود در بانک اطلاعاتی String، ارتباط و برهمکنش ژن لیپوکسیژناز با فاکتور رونویسی WRKY تأیید شد (شکل ۵-ب). مطالعات نشان داده ژن‌های WRKY70 و LOX در گوجه‌فرنگی‌های تیمار شده با سویه‌های استرپتومایسس بیان افتراقی داشتند (Abbasi et al., 2019). نتیجه برهمکنش ژن‌های موجود در ماژول مشکی نشان می‌دهد، پروتئین ترپن سنتاز^۱ بیشترین برهمکنش را با سایر پروتئین‌های شبکه دارا است (۴۰ رابطه). بعد از ترپن سنتاز، بیشترین برهمکنش متعلق به فاکتور رونویسی WRKY است (با ۲۶ برهمکنش) (شکل ۵-الف).

ماژول آبی

بررسی نقش و عملکرد ژن‌های موجود در این ماژول نشان داد تعداد زیادی ژن به صورت مستقیم یا غیرمستقیم به محرک‌های زیستی و غیرزیستی پاسخ می‌دهند. ژن‌های این ماژول در رقم حساس بیشتر بیان شدند (شکل ۳-ب). بیشتر محصولات ژن‌های این ماژول کارکردهای مولکولی از جمله برهمکنش انتخابی یک مولکول با یک یا چند مکان خاص روی مولکول دیگر (binding) و فعالیت کاتالیزوری بود (شکل ۴-ب). از جمله ژن‌های مهم این ماژول موارد زیر را می‌توان نام برد:

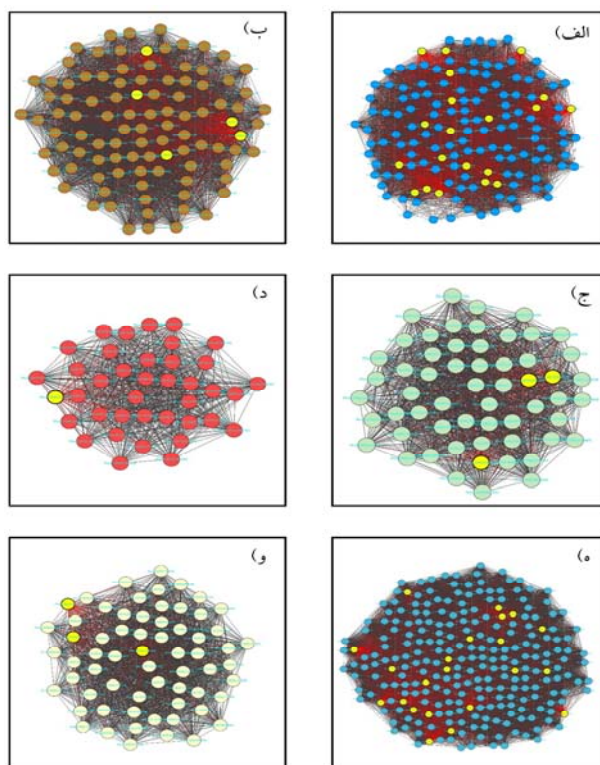
پروتئین مقاومت به بیماری کلاس TIR-NBS-LRR^۲ که در غشای سلول قرار دارد و شامل تکرارهای غنی از لوسین است. دارای شباهت بالایی به عوامل رونویسی است. پروتئین مقاومت به بیماری حاوی دامنه NB-ARC^۳ که درگیر در فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است. پروتئین مقاومت به بیماری کلاس CC-NBS-LRR^۴ که باعث ایجاد یک سیستم دفاعی

1. Terpene synthase
2. Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
3. NB-ARC domain-containing disease resistance protein
4. Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family

ماژول قهوه‌ای

بررسی عملکرد ژن‌های این ماژول نقش پررنگ آن‌ها را در فرآیند فتوسنتز نشان داد. اکثر ژن‌های این ماژول دارای کارکرد مولکولی و فرآیندهای زیستی بودند، به‌ویژه در دسته کاتالیزورها، اتصال‌دهنده و دخیل در فرآیندهای متابولیکی جای گرفتند (شکل ۴-ج). بیان ژن‌های این ماژول در هر دو رقم حساس و مقاوم یک روز پس از تیمار به بیشترین میزان خود رسید که این میزان در رقم حساس کمی بالاتر از رقم مقاوم بود اما در تیمار پس از پنج روز میزان بیان این ژن‌ها در هر دو رقم کاهش پیدا کرد (شکل ۳-ج)، بررسی و ارزیابی همبستگی میان ماژول‌ها و ارقام در زمان‌های مختلف نیز این نتیجه را تأیید کرد (شکل ۲).

از جمله مهم‌ترین ژن‌های درگیر در عمل فتوسنتز می‌توان آنزیم NADP-مالیک^۱ که پیروات را برای اکسیداسیون در چرخه تری‌کربوکسیلیک‌اسید تولید کند (Artus & Edwards, 1985)، جریان الکترونی حلقوی وابسته به NDH^۲ که در تنظیم فعالیت NDH نقش دارد، فاکتور سیگما^۳ که عوامل آغازکننده‌ای هستند که پیوند PEP را به محل‌های شروع خاص ترویج می‌کنند و سپس آزاد می‌شوند، ژن‌های خانواده چاپرونین TCP-1/cpn60^۴ که به تا شدن پروتئین‌ها کمک می‌کنند و ژن خانواده PsbP مرکز واکنش فتوسیستم II^۵ که عملکرد آن به عنوان اتصال یون کلسیم توصیف می‌شود که در فتوسنتز مشارکت دارد را نام برد.



شکل ۶. نمایش شبکه‌ای ارتباط ژن‌های ماژول‌های مختلف در cytoscape.

1. NADP-malic enzyme 4
2. NDH-dependent cyclic electron flow 5
3. Sigma factor 4
4. TCP-1/cpn60 chaperonin family protein
5. Photosystem II reaction center PsbP family protein

مولکولی بودند و به‌نظر می‌رسد کارکرد بیشتر محصولات ژنتیکی این ژن‌ها برای مقابله با تنش گرمایی است (شکل ۴-ه). میزان بیان ژن‌های این ماژول در هر دو رقم مقاوم و حساس در زمان صفر بالا بوده و در روز اول پس از تیمار به‌شدت میزان بیان کاهش یافت ولی در پنج روز پس از تیمار ژن‌های این ماژول با شرایط تنش کمی سازگاری پیدا کرده و میزان بیان افزایش یافت با این وجود میزان بیان ژن‌ها به اندازه گیاه شاهد افزایش نداشت (شکل ۳-ه). از جمله ژن‌های این ماژول می‌توان پروتئین‌های zinc fingerfamily که خانواده‌ای از عوامل رونویسی را تشکیل می‌دهند که در پاسخ به استرس‌های مختلف نقش اساسی دارند را نام برد (Yin et al., 2017). اکثر پروتئین‌های Zinc Finger از نوع CCCH با متابولیسم RNA همراه هستند، از جمله برش RNA، تخریب RNA، پلی‌آدنیل‌اسیون RNA، صادرات RNA (export) و اتصال به RNA (Hurt et al., 2009). در شبکه String بیشترین احتمال برهمکنش مربوط به ژن HSP20-like chaperones superfamily با protein mitochondrial-localized small با heat shock protein 23.6 با مقدار ۰/۸۴۲ بود که در پاسخ به گرما دخیل می‌باشند. در شبکه حاصل از Cytoscape ژن کد کننده پروتئین zinc fingerfamily با بقیه ژن‌ها برهمکنش قابل توجه داشت (شکل ۶-د).

ماژول فیروزه‌ای

این ماژول بزرگ‌ترین ماژول در این مطالعه شناخته شد. بیشترین تعداد ژن‌های موجود در این ماژول در تولید متابولیت‌های ثانویه نقش داشتند، که این متابولیت‌ها نقش مؤثری در دفع آفات گیاهی دارند (شکل ۴-و). میزان بیان ژن‌های این ماژول پس از تیمار افزایش

در شبکه حاصل از پایگاه داده String، ژن sig4 با ژن THIC بیشترین هم‌بینایی را نشان داد. در نتیجه این دو ژن از ژن‌های موردنیاز در فرآیند فتوسنتز هستند که این نتیجه در گیاه سویا نیز به اثبات رسیده است (Bueno et al., 2009). این شبکه در مجموع ۴۸۴۵ برهمکنش داشت که بیشترین برهمکنش متعلق به ژن کدکننده پروتئین TPR^۱ بود (۹۲ برهمکنش) (شکل ۶-ب). پروتئین‌های TPR درگیر در پاسخ‌های جیبرلین، سیتوکینین و اکسین و همچنین بیوستنز اتیلن هستند (Yoshida et al., 2005).

ماژول سبز

بیشترین تعداد ژن‌های این ماژول در دسته کاتالیزورها قرار گرفتند (شکل ۴-د). بیشترین میزان بیان ژن‌های این ماژول به ترتیب در گیاه مقاوم بدون تیمار و گیاه مقاوم در تیمار پنج روزه بود (شکل ۳-د). میان این ماژول با ماژول فیروزه‌ای و قرمز همبستگی وجود داشت. از عملکرد ژن‌های این ماژول می‌توان نتیجه گرفت که تعدادی از ژن‌های این ماژول نیز در دفاع در برابر تنش به خصوص تنش‌های غیرزیستی دخیل هستند که از میان آن‌ها می‌توان به گالاکتینول‌سینتاز^۲ و ژن‌های خانواده دهیدرین^۳ اشاره کرد که در حفاظت از گیاه در برابر تنش خشکی نقش دارند. در شبکه String بیشترین برهمکنش متعلق به ژن AT3G03341.1 با ژن‌های خانواده دهیدرین با احتمال ۰/۹۲ بود. این شبکه در کل شامل ۱۵۷۱ برهمکنش بود که در آن ژن‌های سینامیل‌الکل‌دهیدروژناز^۴ با ۴۸ برهمکنش بیشترین ارتباط را با ژن‌های دیگر داشت (شکل ۶-ج).

ماژول قرمز

بیشتر تعداد ژن‌های این ماژول دارای عملکردهای

1. Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
2. Galactinol synthase 1
3. Dehydrin family protein
4. cinnamyl alcohol dehydrogenase 9

5. CCCH-type zinc fingerfamily protein with RNA-

زمان صفر و پنج روز پس از تیمار بیان این ژن‌ها بسیار پایین بود و در گیاه حساس در هر سه زمان (صفر، ۱ و ۵ روز پس از تیمار) نرخ بیان پایین نشان دادند (شکل ۳-۳). بیشتر ژن‌های این ماژول دارای فعالیت کاتالیزوری و سپس ژن‌های دخیل در متابولیت‌های ثانویه بودند (شکل ۴-۴). از مهم‌ترین ژن‌های دخیل در فرآیندهای هورمونی می‌توان به ژن‌های خانواده مس‌آمین اکسیداز^۴، لیپوکسیژناز و شبه‌گیرنده‌های مالکتین‌کیناز^۵ اشاره کرد. مس‌آمین اکسیداز (CuAOs) کاتالیزکننده پلی‌آمین‌ها است که باعث تولید آمونیوم، آمینوآلدهید و پراکسید هیدروژن می‌شود. CuAOهای گیاهی توسط هورمون‌های مرتبط با استرس، متیل‌جاسمونات، آسبیزیک‌اسید و سالیسیلیک‌اسید ایجاد می‌شوند. RKهای شبیه به مولکتین به دلیل نقش‌های همه‌کاره آن‌ها در سیگنال‌دهی هورمون‌ها، رشد، تولیدمثل و واکنش‌های استرس توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (Franck et al., 2018).

در شبکه String تنها احتمال برهمکنش و ارتباط مربوط به ژن‌های EXL5 و AT1G10020^۱ بود. این شبکه در مجموع ساده و دارای برهمکنش‌های دو به دو بود. در این شبکه ۲۰۱۶ برهمکنش وجود داشت. مس‌آمین اکسیداز بیشترین برهمکنش را با سایرین داشت (شکل ۶-۶). با توجه به اینکه مس‌آمین اکسیدازهای گیاهی توسط هورمون‌های مرتبط با استرس تولید می‌شوند (Fraudentali et al., 2020)، می‌توان نتیجه گرفت ژن‌های مرتبط با این هورمون‌ها بیشتر بیان شده‌اند.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

گیاهان برای زنده ماندن در شرایط تنش باید بتوانند

یافت و بیشترین میزان بیان مربوط به تیمار پس از پنج روز در گیاه مقاوم بود (شکل ۳-۳). و بررسی و ارزیابی همبستگی میان ماژول‌ها و ارقام در زمان‌های مختلف تحت تنش نیز این افزایش بیان را تأیید کرد (شکل ۲). طبق آنالیز همبستگی ماژول‌ها، این ماژول بیشترین میزان همبستگی را با ماژول سبز داشت. از ژن‌های مهم این ماژول به موارد زیر می‌توان اشاره کرد:

UDP-گلیکوزیل ترانسفراز^۱، گلیکوزیل ترانسفراز مخروطی الکل که به طور خاص آلدهیدهای سیناپیل و مخروطی را گلیکوزیله می‌کند. تصور می‌شود که این آنزیم در متابولیسم لیگنین نقش دارد. ژن‌های خانواده پراکسیداز^۲، در اکسیداسیون کاهنده‌های سمی، بیوسنتز و تخریب لیگنین، کاتابولیسم اکسین، پاسخ به تنش‌های محیطی مانند زخمی شدن، حمله پاتوژن و استرس اکسیداتیو نقش دارد.

براساس نتایج شبکه ژنی حاصل از بانک اطلاعاتی String، بیشترین برهمکنش مربوط به ژن سینامات هیدروکسیلاز^۳ بود. این ژن در ساخت بسیاری از مولکول‌های دفاعی نقش دارد و به دلیل تحت تنش بودن، گیاهان ترکیبات دفاعی بیشتری نیاز داشته و در نتیجه میزان بیان ژن‌های دخیل در ساخت ترکیبات دفاعی افزایش یافته است. این شبکه شامل ۳۰۹۹۱ برهمکنش بود. در این شبکه ژن Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein بیشترین برهمکنش را با دیگر ژن‌ها داشت (۲۴۵ برهمکنش) (شکل ۶-۵).

ماژول زرد

اکثر ژن‌های این ماژول دخیل در فرآیندهای هورمونی بودند. ژن‌های این ماژول در یک روز بعد از تیمار در گیاه مقاوم به میزان زیادی بیان شدند اما در

4. Copper amine oxidase family protein
5. Maelctin/receptor-like protein kinase family protein
6. Protein of unknown function (DUF1005)

1. UDP-glucosyl transferase 72E1
2. Peroxidase superfamily protein
3. Cinnamate-4-hydroxylase

به بیماری حاوی دومین NB-ARC و ژن‌های مقاومت به بیماری کلاس TIR-NBS-LRR هر دو در ماژول سبز قرار گرفتند و همبستگی نشان دادند. این ژن‌ها در رقم مقاوم بیان بالا و در رقم حساس بیان پایینی داشتند.

ژن‌های شناسایی شده در این مطالعه می‌توانند به عنوان اهداف امیدبخشی برای کاهش آسیب‌های ناشی از تنش به‌کار روند. همچنین می‌توانند امکان انتخاب گیاهان مقاوم به این تنش را در برنامه‌های اصلاحی فراهم کنند.

استفاده از ژن مقاومت به بیماری حاوی دومین NB-ARC، ژن‌های مقاومت به بیماری کلاس TIR-NBS-LRR و ژن‌های خانواده LRR جهت ایجاد مقاومت به تنش زیستی در پروژه مهندسی ژنتیک و تولید گیاهان مقاوم به تنش کنه تارتین دولک‌های می‌توان بهره برد. ارزیابی مقاومت آنتی‌زنوز و آنتی‌بیوز در ژنوتیپ‌های مختلف و انتخاب ژنوتیپ مناسب جهت بررسی پاسخ به تنش کنه تارتین دولک‌های و ارزیابی رفتار ژنوتیپ‌های درگیر به تنش کنه تارتین دولک‌های در بازه زمانی طولانی‌تر در مطالعات آینده باید مدنظر قرار گیرد.

به‌سرعت به تنش پاسخ دهند. مطالعات مولکولی در گیاهان مختلف نشان می‌دهد این مکانیسم‌ها شامل شبکه‌های پیچیده‌ای از تنظیم بیان ژن است. با توجه به زیان قابل ملاحظه کنه تارتین دولک‌های بر کیفیت و کمیت گیاه لوبیا و پیچیدگی مکانیسم‌های مقاومت، از روش سامانه‌های زیستی برای یافتن شبکه‌های ژنی درگیر در این تنش استفاده شد. مطالعه ترانسکریپتوم دو رقم ناز و اختر نشان داد تعداد زیادی از ژن‌های مؤثر در پاسخ‌های دفاعی، فاکتورهای رونویسی، کینازها و مسیرهای انتقال پیام افزایش و یا کاهش بیان معنی‌داری داشتند. ماژول فیروزه‌ای، از نظر تعداد، بیشترین ژن‌های درگیر در مقاومت را دارا بود. این ماژول بیشترین همبستگی را با رقم مقاوم پس از پنج روز آلودگی داشت. ماژول زرد بیشترین همبستگی را با رقم مقاوم پس از یک روز آلودگی داشت، ژن‌های خانواده پراکسیداز و UDP-گلیکوزیل ترانسفراز در ماژول فیروزه‌ای و ژن‌های خانواده LRR و شبه‌گیرنده‌های مالکتین کیناز در ماژول زرد قرار داشتند که در رقم حساس بیان پایینی داشتند. ماژول مشکی بیشترین همبستگی با رقم حساس پس از پنج روز آلودگی را داشت. ژن مقاومت

REFERENCES

- Abbasi, S., Safaie, N., Sadeghi, A., & Shamsbakhsh, M. (2019). *Streptomyces* strains induce resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in tomato through different molecular mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1505.
- Artus, N. N., & Edwards, G. E. (1985). NAD⁺ malic enzyme from plants. *FEBS letters*, 182(2), 225-233.
- Bergmann, S., Ihmels, J., Barkai, N., & Eisen, M. (2004). Similarities and differences in genome-wide expression data of six organisms. *PLoS biology*, 2(1), e9.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes. *Plant and soil*, 252(1), 55-128.
- Bueno, A. D. F., Bueno, R. C. O. D. F., Nabity, P. D., Higley, L. G., & Fernandes, O. A. (2009). Photosynthetic response of soybean to twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) injury. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 825-834.
- Creelman, R. A., Bell, E., & Mullet, J. E. (1992). Involvement of a lipoxygenase-like enzyme in abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology*, 99(3), 1258-1260.

- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., ... & Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15-21.
- Franck, C. M., Westermann, J., & Boisson-Dernier, A. (2018). Plant malectin-like receptor kinases: from cell wall integrity to immunity and beyond. *Annual Review of Plant Biology*, 69, 301-328.
- Fraudentali, I., Ghuge, S. A., Carucci, A., Tavladoraki, P., Angelini, R., Rodrigues-Pousada, R. A., & Cona, A. (2020). Developmental, hormone-and stress-modulated expression profiles of four members of the Arabidopsis copper-amine oxidase gene family. *Plant Physiology and Biochemistry*, 147, 141-160.
- Grbić, M., Van Leeuwen, T., Clark, R. M., Rombauts, S., Rouzé, P., Grbić, V., ... & Van de Peer, Y. (2011). The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature*, 479(7374), 487-492.
- Heese, A., Hann, D. R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A. M., He, K., Li, J., ... & Rathjen, J. P. (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(29), 12217-12222.
- Hopper, D. W., Ghan, R., Schlauch, K. A., & Cramer, G. R. (2016). Transcriptomic network analyses of leaf dehydration responses identify highly connected ABA and ethylene signaling hubs in three grapevine species differing in drought tolerance. *BMC plant biology*, 16(1), 1-20.
- Hurt, J. A., Obar, R. A., Zhai, B., Farny, N. G., Gygi, S. P., & Silver, P. A. (2009). A conserved CCCH-type zinc finger protein regulates mRNA nuclear adenylation and export. *Journal of Cell Biology*, 185(2), 265-277.
- Jain, S., Chittam, K., Brueggeman, R., Osorno, J. M., Richards, J., & Nelson Jr, B. D. (2016). Comparative transcriptome analysis of resistant and susceptible common bean genotypes in response to soybean cyst nematode infection. *PLoS One*, 11(7), e0159338.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *nature*, 444(7117), 323-329.
- Katungi, E., Sperling, L., Karanja, D., Farrow, A., & Beebe, S. (2010). Relative Importance of Common Bean Attributes and Variety Demand in the Drought Areas of Kenya. *International Journal of Tropical Agriculture and Food Systems*, 4(3), 194-205.
- Kavousi, A. (2000). *Laboratory evaluation of three pesticides on the predatory mite, Phytoseiulus persimillis* (Doctoral dissertation, M. Sc. Thesis, College of Agriculture, University of Tehran, Iran. 170 pp.(In Persian with English Summary)).
- Langfelder, P., & Horvath, S. (2008). WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC bioinformatics*, 9(1), 1-13.
- Mortezaeefar, M., Fotovat, R., Shekari, F., & Sasani, S. (2017). Weighted gene co-expression network analysis of regulatory modules by jasmonic acid in Arabidopsis. *Crop Biotechnology*, 7(17), 55-71. (in persian)
- Moschen, S., Higgins, J., Di Rienzo, J. A., Heinz, R. A., Paniego, N., & Fernandez, P. (2016). Network and biosignature analysis for the integration of transcriptomic and metabolomic data to characterize leaf senescence process in sunflower. *BMC bioinformatics*, 17(5), 389-398.
- Niemi, J. (2007). Accuracy of the Bayesian network algorithms for inferring gene regulatory networks. *Independent research projects in applied mathematics Mat-2.108, Helsinki University of Technology*.

- O'Rourke, J. A., Iniguez, L. P., Fu, F., Bucciarelli, B., Miller, S. S., Jackson, S. A., ... & Vance, C. P. (2014). An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. *BMC genomics*, *15*(1), 1-17.
- Onstad, D. W., & Knolhoff, L. (2014). Arthropod resistance to crops. In *Insect Resistance Management* (pp. 293-326). Academic Press.
- Schaefer, R. J., Michno, J. M., & Myers, C. L. (2017). Unraveling gene function in agricultural species using gene co-expression networks. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, *1860*(1), 53-63.
- Schmutz, J., McClean, P. E., Mamidi, S., Wu, G. A., Cannon, S. B., Grimwood, J., ... & Jackson, S. A. (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature genetics*, *46*(7), 707-713.
- Serin, E. A., Nijveen, H., Hilhorst, H. W., & Ligterink, W. (2016). Learning from co-expression networks: possibilities and challenges. *Frontiers in plant science*, *7*, 444.
- Shih, K. C., Chen, R. M., Hu, R. M., Liu, F. M., Chen, H. K., & Tsai, J. J. (2004, December). Prediction of gene regulatory networks using differential expression of cDNA microarray data. In *IEEE Sixth International Symposium on Multimedia Software Engineering* (pp. 378-385). IEEE.
- Yin, M., Wang, Y., Zhang, L., Li, J., Quan, W., Yang, L., ... & Chan, Z. (2017). The Arabidopsis Cys2/His2 zinc finger transcription factor ZAT18 is a positive regulator of plant tolerance to drought stress. *Journal of Experimental Botany*, *68*(11), 2991-3005.
- Yoshida, H., Nagata, M., Saito, K., Wang, K. L., & Ecker, J. R. (2005). Arabidopsis ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases. *BMC Plant Biology*, *5*(1), 1-13.
- Zhang, B., & Horvath, S. (2005). A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Statistical applications in genetics and molecular biology*, *4*(1).