Downloaded from ncmbjpiau.ir at 21:58 +0330 on Saturday March 17th 2018

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم، شماره بیست و نهم - زمستان ۱۳۹۶

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بازسازی شبکه‌های ژنی دخیل در پاسخ به تنش خشکی درگیاه جو

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

۱. گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران
۲. گروه پژوهشی زیست‌شناسی سیستم‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۳. گروه پژوهشی فیزیولوژی مولکولی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

چکیده:

سابقه و هدف: با توجه به اهمیت تنش خشکی و نظر به این‌که تحمل به تنش خشکی صفتی چند ژنی می‌باشد، هدف پژوهش حاضر بازسازی شبکه ژنی درگیر و شناسایی ژن‌های کلیدی دخیل در تنش خشکی درگیاه جو با استفاده از تجزیه و تحلیل داده‌های ریزآرایه و هم‌چنین شناسایی فرآیندهای مؤثر بوده است.

مواد و روش‌ها: تمامی ژن‌های دارای بیان افتراقی (≤ ۲/۵ و≥ ۲/۵-) در بین تمامی آزمایش‌های ریزآرایه انجام شده، با استفاده از نرم‌افزار Genevestigator شناسایی شدند. ترسیم شبکه برهم‌کنش پروتئینی و شناسایی ژن‌های کلیدی با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape و بررسی هستی شناسی ژن‌ها به‌وسیله نرم افزار AgriGO صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده از بازسازی شبکه برهم‌کنش پروتئینی منجر به شناسایی ۱۴ و ۱۵ ژن کلیدی دخیل در تنش خشکی به‌ترتیب در مرحله نموی رویشی و زایشی شد.

بحث: براساس نتایج به‌دست آمده، از مؤثرترین ژن‌های کلیدی دخیل در تحمل به تنش خشکی می‌توان به ژن‌های عوامل رونویسی ARF1، ABF3، DREB1A، DREB2A، HY5 و HYH اشاره کرد.

نتیجه‌گیری: بررسی هستی شناسی ژن‌های پاسخ‌دهنده به خشکی و هاب روشن ساخت که تنظیم فرآیندهای زیستی، فرآیندهای متابولیسمی، کنترل دوره نوری و فتوسنتز و هم‌چنین تنظیم زمان گل‌دهی از مهم‌ترین فرآیندهای تأثیرگذار بر این تنش می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: گیاه جو، تنش خشکی، شبکه‌های زیستی، ژن هاب

مقدمه

از مهم‌ترین عوامل محدود کننده عملکرد گیاهان زراعی تنش-های زیستی و غیر زیستی است. یکی از تنش‌های زیستی مهم تنش خشکی یا کم آبی می‌باشد (۴۴). تغییرهای آب و هوایی که در سراسر جهان رخ داده، باعث شده است که میزان بارش سالانه کاهش و دمای بیش‌تر مناطق افزایش یابد. با توجه به اینکه کشور ایران نیز در منطقه گرم و نیمه خشک واقع شده است، به همین دلیل توسعه و کشت ارقام متحمل به خشکی با استفاده از روش‌های جدید زیست فناوری امری لازم و ضروری می‌باشد (۱۹،۳۰،۱۱). گیاه جو (*Hordeumvulgare L.*) بعد از گندم، برنج و ذرت چهارمین غله با ارزش دنیاست (۵). این گیاه دارای سازگاری وسیع اکولوژیکی بوده و نسبت به سایر گیاهان خانواده غلات تحمل بیش‌تری نسبت به خشکی دارد. به‌دلیل این‌که طیف گسترده‌ای از مطالعه‌های فیزیولوژیکی، مرفولوژیکی و ژنومی در مورد این گیاه انجام شده است و هم‌چنین تنوع زیاد ژنومی این گیاه به اثبات رسیده است، این گیاه به‌عنوان یک گیاه مدل مناسب برای بررسی تنش‌های غیر زنده انتخاب شده است (۴۰، ۳۳،۲۹،۲۸، ۵). امروزه فن‌آوری‌های اومیکس طلایه‌دار روش‌های جدیدی هستند که برای کاوش در ترانسکریپتوم، پروتئوم، متابولوم و دیگر سطوح کارکردی ژنوم به‌کار می‌روند. این فن‌آوری با

نویسنده مسئول : گروه زیست‌شناسی سیستم‌ها، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
پست الکترونیکی: shobbar@abrii.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۲۹

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 21:58 +0330 on Saturday March 17th 2018

روشن نمودن نحوه فعالیت ژنوم در یک شرایط تکاملی یا محیطی خاص، تعیین روابط بین ژن‌ها، شناسایی نقش بخش-های کدکننده و غیر کدکننده ژنوم و مشخص نمودن نقاط کلیدی تنظیم فرآیندهای تکاملی و پاسخ به عواملی درونی و بیرونی گیاه، علاوه بر ایجاد تصویری جامع و روشن از نحوه فعالیت ژنوم، راه را برای دست‌ورزی ژنتیکی و مهندسی گیاهان در جهت بهبود صفات مورد نظر هموارتر و روشن‌تر می‌نمایند (۱۶،۵۰). بر همین اساس آشکار است که گام بعدی مطالعه‌های آزمایشگاهی، تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی بیوانفورماتیکی عملکرد این ژن‌ها و محصول‌های آن‌ها در ابعاد سلول و نحوه ارتباط آن‌هاست. بنابراین به‌منظور استفاده از اطلاعات به‌دست آمده از پروژه‌های ژنومی و اطلاعات عملکردی لازم است که این داده‌ها با استفاده از رایانه به‌صورت دسته‌بندی شده در بیاید. بر همین اساس گام نخست استفاده از ابزارهای به نسبت جدیدی با کارایی به مراتب بالاتر در گردآوری و تجزیه و تحلیل جامع ژن‌های مؤثر در این تنش می‌باشد. بسیاری از ابزارها به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌های موجود در پایگاه داده‌های عمومی وجود دارد که یکی از این ابزارها Genevestigator می‌باشد که در سال ۲۰۰۴ ارائه گردید (۳۱ ، ۲۲) Genevestigator یک پایگاه داده و مرورگر وب با قابلیت داده‌کاوی برای داده‌های ریزآرایه می‌باشد که مجهز به ابزار تجزیه و تحلیل بیان داده است. ابزار تجزیه و تحلیل آنلاین اجازه می‌دهد طیف وسیعی از سؤال‌هایی در مورد بیان ژن در طول مراحل رشد و نمو، تنش و یا بافت با ویژگی خاص به‌منظور کشف الگوهای بیان ژن مربوطه، مورد بررسی قرار گیرد. به استناد خود این وب سایت (https://genevestigator.com)، رتبه یک ارجاع در بین تمامی ابزارهای بیان ژن در بخش زیست‌شناسی گیاهی در تمامی مجله‌های علمی معتبر (بیش از ۲۰۰۰ مورد) مربوط به این پایگاه می‌باشد. از آنجائی‌که نتیجه برهم‌کنش ژن‌ها و پروتئین‌های مؤثر با عناصر داخل سلول، تعیین کننده عملکرد سلول در تحمل به تنش خشکی می‌باشند، گام بعدی تحقیق باید شناسایی ژن‌های کلیدی با بیش‌ترین ارتباط در سطح سلول باشد، و در نهایت بایستی عملکرد ژن‌های شناسایی شده در قالب شبکه‌های تنظیمی مشخص گردد.

بنابراین آگاهی از مکانیسم‌های دفاعی گیاه در مقابله با تنش خشکی لازم است تا بتوان در مراحل بعدی ژن‌های مسئول این مکانیسم‌ها را شناسایی کرد. همان‌طور که در بالا اشاره شد، بررسی مکانیسم‌های تحمل به خشکی در گیاه جو، درک بهتر پایه ژنتیکی تحمل به خشکی را آسان می‌نماید و راه کارهای مناسب ژنتیکی و ژنومی را برای بهبود صفت تحمل به خشکی مطرح می‌نماید. در گیاه جو نیز شناسایی ژن‌های پاسخ دهنده به خشکی با استفاده از بررسی پروفایل بیان هم-چون ریزآرایه انجام شده است. بنابراین تعدادی آزمایش با استفاده از روش ریزآرایه برای بررسی بیان ژن‌ها در گیاه جو تحت تنش خشکی گزارش شده است (۴۸،۴۵،۳۷،۱، ۵۳). در این پژوهش سعی شده است ژن‌های دارای بیان افتراقی در پاسخ به تنش خشکی در گیاه جو در اندام‌های رویشی و زایشی توسط ابزار تحت وب Genevestigator شناسایی شوند سپس ژن‌هایی با بیش‌ترین ارتباط در سطح سلول شناسایی شوند و تجزیه و تحلیل این ژن‌ها و بررسی عملکرد آن‌ها در قالب شبکه‌های تنظیمی ژنی انجام شود تا بینش عمیق‌تری نسبت به عملکرد پیچیده تحمل گیاه جو نسبت به پدیده خشکی به‌دست آید.

مواد و روش‌ها

با استفاده از ابزار جستجوی ژن[1] نرم افزار تحت وب Genvestigator تمامی ژن‌های دارای تغییر بیان بالاتر و مساوی ۲/۵ و پایین تر و مساوی ۲/۵- در حالت تنش خشکی نسبت به شرایط نرمال در بین تمامی آزمایش‌ها ریزآرایه انجام شده در گیاه جو (جدول ۱)، به‌دست آمد. این ژن‌های افتراقی از لحاظ دوره رویشی و زایشی مربوطه دسته بندی شدند. این ژن‌های افتراقی از لحاظ دوره رویشی و زایشی مربوطه دسته-بندی شدند. اورتولوگ این ژن‌ها در گیاه برنج از طریق ابزارهای BLASTx و BLASTn شناسایی شد (۲،۳)، و به-منظور رسم شبکه ژنی از اورتولوگ‌های این ژن‌ها در برنج استفاده شد. تمامی ژن‌های شناسایی شده، در نرم‌افزار Pathway Studio 9.0 و از طریق Plant database آن بررسی شد (۳۴). پس از جستجوی تمامی ژن‌ها توسط نرم‌افزار، همسایه‌های آن‌ها نیز به دست آمد. در نهایت نیز بر اساس کل ژن‌های شناسایی شده و همسایه‌ها، شبکه ژنی بین آن‌ها در سلول بازسازی و رسم گردید.

جدول ۱. اطلاعات داده‌های ریزآرایه مورد استفاده در این پژوهش

No	Series	Technology	Developmental Stage	Reference
1	SE6990	Affymetrix	Vegetative Stage	Tommasini 2008
2	SE15970	Affymetrix	Reproductive Stage	Guo P et al. 2009
3	SE17669	Affymetrix	Reproductive Stage	Abebe et al. 2010

1 - Gene Search Tool

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 21:58 +0330 on Saturday March 17th 2018

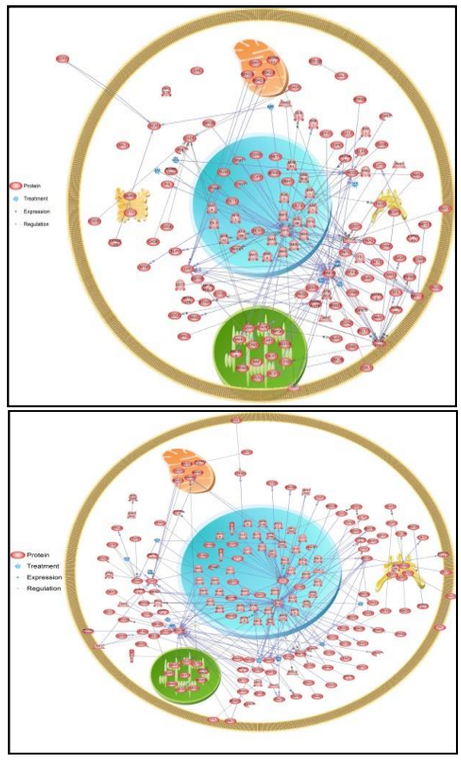
فهرست نهایی ژن‌ها در نرم افزار Pathway Studio 9.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و فهرست PPI[1] تهیه شد.
برای رسم شبکه برهم‌کنش پروتئینی و شناسایی ژن‌های مؤثر در این شبکه از نرم‌افزار Cytoscape پلاگین Cytohubba استفاده شد (۴۳) برای شناسایی ژن‌های هاب (۱۰ گره با بیش‌ترین برهم‌کنش) در شبکه از ۳ الگوریتم محاسباتی Cyto-Hubba (Degree، Closeness وMNC[2]) استفاده شد. اطلاعات حاصل از بررسی هستی‌شناسی تمامی ژن‌های مورد بررسی شامل کل ژن‌های دارای بیان افتراقی در شرایط خشکی (شناسایی شده توسط Genevestigator) و هم‌چنین ژن‌های هاب (شناسایی شده توسط الگوریتم‌های Cyto-Hubba) به وسیله نرم‌افزار تحت وب AgriGO استخراج شد. تمامی ژن‌های مورد بررسی براساس فرآیندهای بیولوژیکی، گروه بندی و تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج :

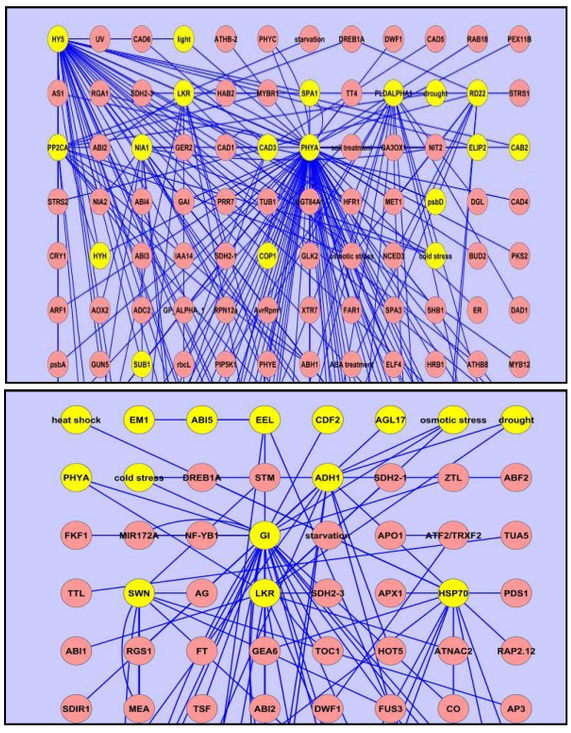
براساس تجزیه و تحلیل دادگان تمامی آزمایش‌ها ریزآرایه با استفاده از ابزار جستجوی ژن در Genvestigator و پس از حذف ژن‌های تکراری به‌دست آمده از نمونه‌های متفاوت تنش خشکی در مجموع در اندام‌های رویشی ۹۰ ژن (حدود ۲۴/۵٪) و در اندام‌های زایشی ۲۴۷ ژن (حدود ۷۲/۵٪) با بیان افتراقی ≥ ۲/۵ و≤ ۲/۵- به‌دست آمد که تنها حدود ۳/۱ ٪ از ژن‌ها در هر دو دوره رویشی و زایشی مشاهده شدند با استفاده از اورتولوگ ژن‌های به‌دست آمده در اندام‌های رویشی (۹۰ ژن) و در اندام‌های زایشی (۲۴۷ ژن) که دارای بالاترین و پایین-ترین بیان در پاسخ به خشکی در گیاه جو هستند، شبکه ژنی براساس بیان و تنظیم به‌وسیله نرم‌افزار Pathway Studio9.0 ترسیم گردید (شکل ۱). با استفاده از ۱۶۳ برهم-کنش پروتئینی به‌دست آمده از نرم‌افزار Pathway Studio 9.0 در اندام‌های رویشی و ۲۱۸ برهم‌کنش پروتئینی در اندام‌های زایشی، شبکه برهم‌کنش پروتئینی توسط نرم‌افزار Cytoscape ترسیم گردید (شکل۲). هم‌چنین با استفاده از ۳ الگوریتم ذکر شده ۱۵ژن با بیش‌ترین برهم‌کنش در بین تمامی این برهم‌کنش‌های پروتئینی در اندام‌های زایشی و ۱۴ژن در اندام‌های رویشی به‌دست آمد. اطلاعات این ژن‌های هاب شناسایی شده به‌طور جداگانه در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است. شبکه بیان و تنظیم ژنی براساس روابط مستقیم بین این ۱۵ ژن در اندام‌های زایشی و ۱۴ ژن در اندام‌های رویشی به‌دست آمد (شکل ۳). بررسی هستی شناسی ژن‌های دخیل در تحمل به تنش خشکی دارای بیان افتراقی ≤۲/۵- و ≥۲/۵ به‌دست آمده با استفاده از ابزار تحت وب Genevestigator در اندام‌های رویشی و زایشی، روشن ساخت که یک‌سری فرآیندهای زیستی از جمله پاسخ به محرک‌ها، تنظیم فرآیندهای زیستی، فرآیندهای متابولیسمی و جای‌گیری[3]در این شرایط غنی شده‌اند (شکل ۴). هم‌چنین در میان ژن‌های هاب شناسایی شده در اندام‌های رویشی و زایشی تنظیم فرآیندهای زیستی مانند تنظیم بیان ژن، فرآیند رونویسی و تنظیم این فرآیند در رتبه اول و انتقال پیام مانند مسیر سیگنالینگ اتیلن در رتبه دوم قرار دارد.

1– Protein- Protein interaction
2- Maximum Neighborhood Component
3- Localization

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 21:58 +0330 on Saturday March 17th 2018



شکل۱. شبکه ژنی روابط ۱۲۳ژن با بیان افتراقی بالاتر و مساوی ۲/۵ و پایین‌تر و مساوی ۲/۵- در شرایط تنش خشکی و همسایه‌های شناخته شده در اندام‌های رویشی گیاه (تصویربالا) و شبکه ژنی روابط ۲۸۶ژن با بیان افتراقی بالاتر و مساوی ۲/۵و پایین‌تر و مساوی ۲/۵- در شرایط تنش خشکی و همسایه‌های شناخته شده در اندام‌های زایشی(تصویر پایین) جو براساس داده‌های نرم‌افزار تحت وب Genvestigator با استفاده از نرم‌افزار Path**way Studio** 9.0 .



شکل۲. شبکه برهم‌کنش پروتئین-پروتئین برای ژن‌های دخیل در پاسخ به تنش خشکی با بیان افتراقی بالاتر و مساوی ۲/۵ و پایین‌تر و مساوی ۲/۵- در اندام‌های رویشی (تصویر بالا) و در اندام‌های زایشی (تصویر پایین) گیاه جو براساس داده-های نرم افزار تحت وب Genvestigator ژن‌های هاب مربوطه (با رنگ زرد مشخص شده‌اند) ترسیم شده با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape.

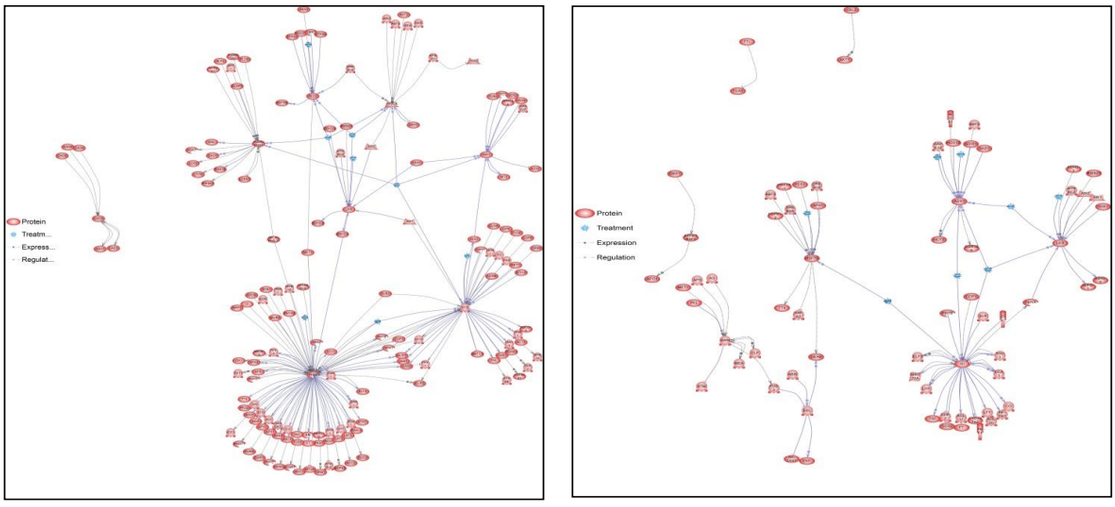
جدول ۲. ۱۵ ژن هاب دارای بیش‌ترین برهم‌کنش در بین ۲۸۶ ژن با بیان افتراقی (با تغییر بیان ≤۲/۵- و ≥۲/۵) در اندام‌های زایشی گیاه جو براساس داده‌های به‌دست آمده از نرم افزار تحت وب Genevestigato.

No.	Orthologous in Rice	Unigene ID Barley	Unigene ID Rice	Selected by	Annotation
1	ABF3	Hv.9381	Os.48133	MNC	Abscisic Acid Insensitive 5-like protein
2	ADH1	Hv.22954	Os.21601	Degree	Alcohol dehydrogenase 1
3	APO1	Hv.19129	Os.75017	MNC	APO protein 1
4	ATF2/TRXF2	Hv.13307	Os.9880		protein disulfide oxidoreductase activity
5	CAD4	Hv.2440	Os.79547	Degree	Cinnamyl alcohol dehydrogenase 4
6	CBL1	Hv.8391	Os.17170	Closeness	Calcineurin B-like protein
7	CLF	Hv.20522	Os.21566	MNC	Histone-lysine N-methyltransferase CLF
8	DREB1A	Hv.20870	Os.14125	MNC,Degree,Closeness	transcription factor
9	DREB2A	Hv.31775	Os.32760	MNC	transcription factor
10	GI	Hv.1530	Os.7987	Degree,Closeness	Protein GIGANTEA
11	HOS1	Hv.15545	Os.15893	Closeness	E3 ubiquitin-protein ligase HOS1
12	HSP70	Hv.24244	Os.87672	MNC,Degree,Closeness	DnaK-type molecular chaperone
13	LKR	Hv.20906	Os.13781	Degree	Alpha-aminoadipic semialdehyde synthase
14	RAB18	Hv.4608	Os.33755	Degree,Closeness	Ras-related protein
15	TTL	Hv.23272	Os.10815	MNC	Uric acid degradation bifunctional protein

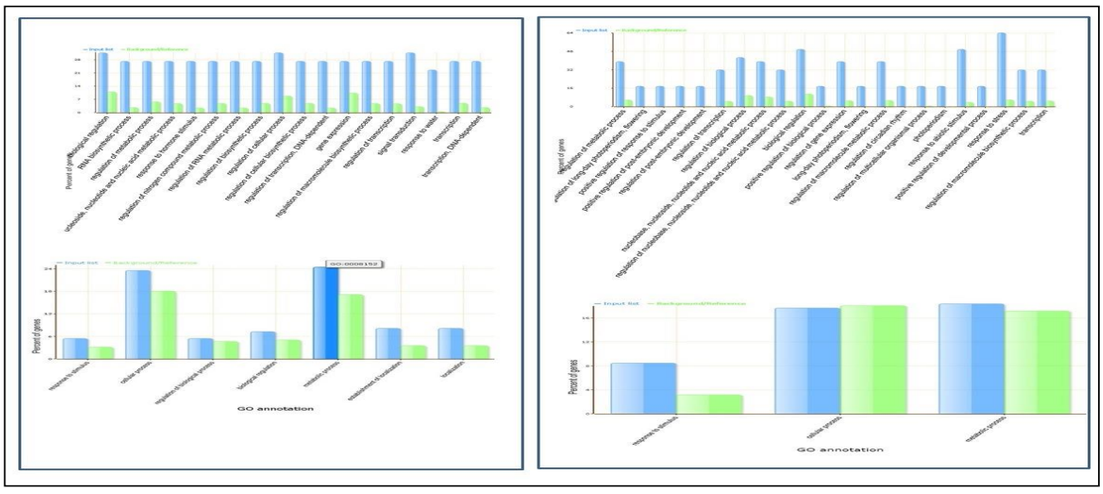
Downloaded from ncmbjpiau.ir at 21:58 +0330 on Saturday March 17th 2018

جدول ۳. ۱۴ ژن هاب دارای بیش‌ترین برهم‌کنش در بین ۱۲۳ژن با بیان افتراقی (با تغییر بیان ≤۲/۵- و ≥۲/۵) در اندام‌های رویشی گیاه جو براساس داده‌های به‌دست آمده از نرم‌افزار تحت وب Genevestigator.

No.	Orthologous in Rice	Unigene ID Barley	Unigene ID Rice	Selected by	Annotation
1	ABI1	Hv.19158	Os.5367	Closeness	Protein phosphatase 2C
2	ARF1	Hv.22906	Os.10276	MNC	transcription factor
3	CAD3	Hv.26567	Os.7496	Degree	lignin biosynthetic process
4	HY5	Hv.33733	Os.80631	MNC,Degree,Closeness	transcription factor
5	HYH	Hv.6541	Os.91160	MNC	transcription factor
6	LKR	Hv.20906	Os.13781	Degree,Closeness	Alpha-aminoadipic semialdehyde synthase
7	NCED3	Hv.13764	Os.55193	MNC	abscisic acid biosynthetic process
8	NIA2	Hv.20595	Os.4717	MNC	Nitrate reductase
9	NRT1.1	Hv.9565	Os.59071	MNC,Degree	auxin-activated signaling pathway
10	PHYA	Hv.21044	Os.272	Closeness	Phytochrome A
11	PLDALPHA1	Hv.2078	Os.155	MNC,Degree,Closeness	phospholipase D alpha 1
12	PP2CA	Hv.18841	Os.27906	Degree,Closeness	Protein phosphatase 2C
13	RAB18	Hv.4608	Os.33755	MNC,Degree,Closeness	Ras-related protein
14	RD22	Hv.22886	Os.8061	Degree	BURP domain protein RD22



شکل ۳. روابط مستقیم ژن‌های دارای بیش‌ترین برهم‌کنش با بیان افتراقی بالاتر و مساوی ۲/۵ و پایین‌تر و مساوی۲/۵- براساس داده‌های نرم‌افزار تحت وب Genvestigator در اندام‌های رویشی (تصویر سمت چپ) و اندام‌های زایشی (تصویر سمت راست) براساس بیان و تنظیم مستقیم یکدیگر ترسیم شده توسط نرم افزار Pathway studio 9.0.



شکل ۴. بررسی هستی شناسی (فرآیندهای زیستی) ژن‌های شناسایی شده دارای بیان افتراقی ≤۲/۵ و ≥۲/۵- در پاسخ به تنش خشکی (شکل پایین) در اندام‌های رویشی گیاه جو (سمت چپ تصویر) و اندام‌های زایشی (سمت راست تصویر) و ژن‌های هاب (شکل بالا) مربوطه براساس داده‌های به‌دست آمده با استفاده از ابزار تحت وب Genevestigator توسط نرم‌افزار تحت وب AgriGO.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 21:58 +0330 on Saturday March 17th 2018

بحث:

در این پژوهش ژن‌های دخیل در پاسخ به تنش خشکی براساس آنالیز داده‌های آزمایش ها ریزآرایه مرتبط شناسایی شدند، شبکه‌های برهم‌کنش پروتئینی بازسازی شد و ژن‌های هاب مشخص شدند که در میان آن‌ها عوامل رونویسی ARF1، ABF3، DREB1A، DREB2A، HY5 و HYH و پروتئین فسفاتازهای ABI1 و PP2CA به‌چشم می‌خوردند. در نهایت با بررسی هستی‌شناسی در مراحل مختلف نموی گیاه جو، تنظیم فرآیندهای زیستی از مهم‌ترین فرآیندهای پاسخ دهنده به تنش خشکی در گیاه جو تشخیص داده شدند. از دیگر فرآیندهای مؤثر در تحمل به خشکی شناسایی شده می‌توان به فرآیندهای متابولیسمی در هر دو مرحله نموی رویشی و زایشی، کنترل دوره نوری، فتوسنتز و هم‌چنین پیام رسانی هورمونی توسط پروتئین‌های کیناز در مرحله نموی رویشی و نیز فرایند کنترل زمان گلدهی در مرحله نموی زایشی اشاره نمود که این با گزارش‌های قبلی هم‌خوانی دارد (۳۶ ، ۱۵). که به‌ترتیب تمام فرآیندهای شناسایی شده و ژن-های کلیدی دخیل در فرآیند مورد بحث قرار می‌گیرد.

عوامل رونویسی تنظیم کننده مسیرهای پاسخ به تنش خشکی

بنا برگزارش‌های ارائه شده مشخص شده است که فرآیندهایی که منجر به افزایش تحمل نسبت به تنش و در نهایت سازگاری گیاه می‌شوند، به‌وسیله چندین مسیر پیام‌رسان تنظیم می‌شوند. نتیجه فعال شدن این مسیرها تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با تنش است، که می‌تواند شامل فعال شدن و یا غیر فعال شدن آن‌ها باشد. از طرف دیگر تنظیم بیان ژن، به‌وسیله مکانیسم‌های مولکولی مختلفی اعمال می‌شود، یکی از مهم‌ترین آنها به‌کارگیری عوامل رونویسی است. این عوامل نه تنها به‌عنوان یک فعال کننده مولکولی برای بیان ژن‌های پاسخ دهنده عمل می‌کنند، بلکه به‌عنوان یک عامل اصلی در فرآیندهای انتقال پیام در شبکه‌های زیستی نقش ایفا می‌کنند (۴۲) عوامل رونویسی با اتصال به پروموترها و میان‌کنش با کمپلکس RNA پلی‌مراز و یا سایر پروتئین‌های میانجی باعث فعال شدن و یا خاموش شدن بیان ژن می‌شوند، بنابراین می-توان گفت که عوامل رونویسی نقش کلیدی را در کنترل مکانیسم‌های تحمل دارند (۴۹). در پژوهش حاضر نیز در مراحل نموی رویشی و زایشی طبق جداول ۲ و ۳ شش عامل رونویسی متعلق به خانواده bZIP و AP2 شناسایی شدند که از جمله ژن‌های مؤثر در تنش خشکی محسوب می‌شوند (۵،۱۲،۵۲). تعدادی از این عوامل رونویسی از جمله DREB1A، DREB2A در گیاه جو کلون شده‌اند و عملکرد تحمل به تنش خشکی در سطح ژنومی و پروتئینی مورد تأیید قرار گرفته است (۲۳، ۲۱).

مکانیسم دفاعی از طریق فرآیندهای متابولیسمی پروتئین

از جمله فرآیندهای متابولیسمی که تحت تنش خشکی متأثر می‌شوند فرایند متابولیسم پروتئین‌ها می‌باشد. طبق شکل ۲ و ۳ در مراحل نموی زایشی و رویشی از ژن‌های هاب شناسایی شده، ژن LKR می‌باشد که مسئول کاتابولیز لیزین در بافت‌ها است. لیزین توسط دو آنزیم کاتابولیز می‌شود LKR[1] و SDH[2] این دو آنزیم توسط یک پروتئین دو عملکردی به هم متصل می‌باشند و توسط یک تک ژن LKR/SDH کد می‌گردند (۲۰،۴) چرخه کاتابولیز لیزین به گیاهان کمک می‌کند که در برابر تنش‌های غیرزیستی مقاوم باشند. در پاسخ به هورمون ABA ژن LKR/SDH تحت شرایط تنش زیستی و غیر زیستی بیان می‌شود و باعث پایداری گیاه در برابر تنش می گردد (۳۲).

مکانیسم تحمل از طریق کنترل دوره نوری و فتوسنتز

فتوسنتز و واکنش‌های نوری جزء اولین فرآیندهای هستند که در مرحله نموی رویشی در گیاهان و از جمله گیاه جو تحت تأثیر تنش خشکی قرار می‌گیرند (۳۶، ۱۵). طبق شکل ۳ (تصویر سمت چپ) یکی از ژن‌های هاب که در پژوهش حاضر ارتباط گسترده و زیادی را با دیگر ژن‌ها برقرار کرده است، ژن *HY5* می‌باشد. این ژن از خانواده عوامل رونویسیbZIPها می‌باشد، که در فرآیند رونویسی ایفاء نقش می‌کند. این عامل رونویسی به پروموتور ژن‌هایی که القا شونده توسط نور هستند به‌طور مستقیم اتصال می‌یابد و باعث بیان این ژن‌ها شده و در توسعه و تکامل پدیده‌های فتومرفولوژیک نقش دارند (۵۱، ۴۸، ۱۷) این عامل رونویسی توسط نور و با اتصال به بالا دست ژن CAB[3] فعال‌سازی می‌شود بررسی‌های بیش‌تر نشان داده است که این ژن در تنظیم ژن‌های وابسته به سیستم فتوسنتز مانند زیر واحد کوچک آنزیم ریبولوز بیس فسفات نقش دارد (۱۷). یکی از پروتئین‌هایی که با این عامل رونویسی در ارتباط است پروتئین فیتوکروم A (PHYA) می‌باشد. فیتوکروم‌ها، گیرنده‌ها و حسگرهای نور در گیاهان هستند که از یک بخش

1- Lysine ketoglutaratereductase
2 - Saccharopine Dehydrogenase
3 - chlorophyll a/b binding protein

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 21:58 +0330 on Saturday March 17th 2018

دریافت‌کننده نور و یک بخش دگرگون‌کننده پیام تشکیل شده‌اند. بخش دریافت‌کننده نور ساختمان تتراپیرولی دارد و از راه اسید آمینه سیستئین به بخش دگرگون‌کننده که نوعی پروتئین است، پیوند می‌شود. فیتوکروم‌ها اغلب فعالیت پروتئین‌کینازی دارند. این مولکول‌ها با پیوند زدن گروه‌های فسفات به پروتئین‌ها، فعالیت آن‌ها را تغییر می‌دهند. بر این اساس، آن‌ها با تغییر فعالیت پروتئین‌هایی که در تنظیم ژن‌ها دخالت دارند، بر فعالیت آن‌ها تأثیر می‌گذارند. ژن‌های زیادی در گیاهان شناخته شده‌اند که از راه فیتوکروم در پاسخ به نور تنظیم می‌شوند. البته، فیتوکروم‌ها بخشی از پاسخ‌های زیستی را از راه تغییرهایی در تعادل یون‌ها در سلول پدید می‌آورند (۵۱،۱۸) فیتوکروم‌ها نور قرمز را در موج ۶۶۰nm و قرمز دور را با طول موج ۷۳۰ nmجذب می‌نمایند بنابراین فیتوکروم‌ها ویژگی بهتری نسبت به سایر گیرنده‌های نوری دارند و توسط یک خانواده کوچک ژنی کد می‌شوند (۵۵). هم‌چنین نقش کنترلی فیتوکروم‌ها در ارتباط با فرآیندهای زیستی مانند رویش بذر (۳۵،۱۳) ،گلدهی (۸) ، سنتز کاروتنوئیدها (۴۶) فلاونوئیدها (۹) فعالیت در مسیرهای سیگنالینگ و پیام رسانی (۴۷،۲۷،۲۴) مشخص شده است. در ارتباط با تنش خشکی نیز، فیتوکروم‌ها تعرق برگی را کنترل می‌نماید (۷). فیتوکروم-ها با ABA مهم‌ترین، مولکول پیام رسان در تنش خشکی، ارتباط و واکنش دارند و باعث کاهش بیان ژن‌های بیوسنتز کننده ABA می‌شوند (۳۹).

مکانیسم دفاعی پیام رسانی هورمونی توسط پروتئین کیناز ها و فسفاتازها

پروتئین کینازها و فسفاتازها تعدادی از ژن‌های هاب را به خود اختصاص داده‌اند. آن‌ها آنزیم‌هایی هستند که مسئول فرآیندهای متعدد سلولی از جمله پاسخ به تنش‌های محیطی می‌باشند (۱۰). طبق شکل ۳ (تصویر سمت چپ) ژن PP2CA [1] از ژن‌های هاب شناسایی شده در مرحله نموی رویشی این پژوهش می‌باشد و نقش‌های مهمی مانند تنظیم همانندسازی، DNA رونویسی ژن و ترجمه پروتئین‌ها را در یوکاریوت‌ها ایفا می‌کند (۲۵) و در گیاهان نیز در پیام‌رسانی هورمونی پاسخ به تنش‌ها، به‌خصوص تنش خشکی نقش دارد (۱۴). هم‌چنین این ژن در سیگنال ABA تأثیرگذار می‌باشد (۳۸) با انتقال یکی از زیرواحدهای این پروتئین به گیاه گندم تحمل به تنش خشکی افزایش یافته است (۵۴).

مکانسیم دفاعی کنترل زمان گل‌دهی

یکی از راه‌های تحمل در برابر تنش خشکی و کمبود آب در دسترس، مکانیسم فرار از خشکی (۶) و انتقال از مرحله رویشی به مراحل زایشی و گلدهی و تشکیل بذر و دانه به منظور بقاء گیاه است (۵۵،۴۱،۲۶). مکانسیم فرار از خشکی از نظر مولکولی ناشناخته است و اطلاعات اندکی موجود می‌باشد ولی پدیده‌ای که با کمبود آب در دسترس بسیار به وقوع می-پیوندد گلدهی زودرس است که در این راستا ژن GI [2]در زود هنگام شدن زمان گلدهی و انجام مکانیسم فرار به هنگام افزایش طول روز و اعمال تنش خشکی، به همراه فیتوهورمون ABA، نقش کلیدی ایفا می‌نماید (۲۶). طبق شکل ۳ (تصویر سمت راست) و بررسی‌های انجام شده در این تحقیق از ژن-های هاب شناسایی شده در اندام‌های زایشی می‌باشد که دارای ارتباطات گسترده با سایر ژن‌ها است.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، شناسایی ژن‌های پاسخ دهنده به خشکی در گیاه جو و بازسازی شبکه‌های ژنی و برهم‌کنش پروتئینی مربوطه، منجر به یافتن ژن‌های هاب در مرحله نموی رویشی (۱۴ ژن) و زایشی (۱۵ ژن) شد که انتظار می‌رود از کلیدی-ترین ژن‌های دخیل در تحمل به خشکی باشند. یعنی هر کدام به تنهایی و هم‌چنین با یکدیگر قادر به افزایش آستانه تحمل نسبت به تنش خشکی در گیاه جو باشند. هم‌چنین در بین این ژن‌ها می‌توان به نقش تأثیرگذار *ARF1*، *ABF3*، *DREB1A*، *DREB2A*، *HY5* و *HYH* اشاره نمود. هم‌چنین بررسی هستی‌شناسی ژن‌های پاسخ‌دهنده به خشکی و هاب روشن ساخت که تنظیم فرآیندهای زیستی، فرآیندهای متابولیسمی، کنترل دوره نوری و فتوسنتز و هم‌چنین تنظیم زمان گلدهی از مهم‌ترین فرآیندهای تأثیرگذار بر این تنش می‌باشند. امید است نتایج به‌دست آمده از این پژوهش در راستای ارتقای تحمل به تنش خشکی در گیاه جو و سایر غلات راه‌گشا باشد.

سپاسگزاری:

این تحقیق در چهارچوب پروژه مصوب شماره ۱-۰۵-۰۵۵۱-۹۱۵۱-۹۱۰۰۱۹۱۰۱۹۱۰۰۱ پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به انجام رسیده است.
نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند به این وسیله از کارکنان پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی که در پیشبرد این پروژه مؤثر بودند، قدردانی نمایند.

1- Serine/threonine-protein phosphatase 2A
2- Gigantea

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 21:58 +0330 on Saturday March 17th 2018

منابع

1.Abebe Tilahun , M. K., Berg Virginia, Wise Roger P.. "Drought response in the spikes of barley: gene expression in the lemma, palea, awn, and seed." Funct Integr Genomics .2010;**10**: 191–205.

2.Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman. "Basic local alignment search tool." J. molecular biology. 1990; **215**(3): 403-410.

3.Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic acids research. 1997; **25**(17): 3389-3402.

4.Anderson, O. D., D. Coleman-Derr, Y. Q. Gu and S. Heath. "Structural and transcriptional analysis of plant genes encoding the bifunctional lysine ketoglutarate reductase saccharopine dehydrogenase enzyme." BMC plant biology. 2010; **10**(1): 113-123.

5.Baum, M., M. Von Korff, P. Guo, B. Lakew, A. Hamwieh, S. Lababidi, S. M. Udupa, H. Sayed, W. Choumane and S. Grando. Molecular approaches and breeding strategies for drought tolerance in barley. Genomics-assisted crop improvement, Springer**:** 2007; 51-79.

6.Bernal, M., M. Estiarte and J. Peñuelas. "Drought advances spring growth phenology of the Mediterranean shrub Erica multiflora." Plant Biology . 2011;**13**(2): 252-257.

7.Boggs, J. Z., K. Loewy, K. Bibee and M. S. Heschel. "Phytochromes influence stomatal conductance plasticity in Arabidopsis thaliana." Plant growth regulation. 2010; **60**(2): 77-81.

8.Brock, M. T., J. N. Maloof and C. Weinig. "Genes underlying quantitative variation in ecologically important traits: PIF4 (phytochrome interacting factor 4) is associated with variation in internode length, flowering time, and fruit set in Arabidopsis thaliana." Molecular Ecology. 2010; **19**(6): 1187-1199.

9.Carvalho, R. F., V. Quecini and L. E. P. Peres. "Hormonal modulation of photomorphogenesis-controlled anthocyanin accumulation in tomato (Solanum lycopersicum L. cv Micro-Tom) hypocotyls: physiological and genetic studies." Plant science . 2010; **178**(3): 258-264.

10.Castells, E. and J. M. Casacuberta. "Signalling through kinase-defective domains: the prevalence of atypical receptor-like kinases in plants." J. experimental botany. 2007; **58**(13): 3503-3511.

11.Cattivelli, L., F. Rizza, F.-W. Badeck, E. Mazzucotelli, A. M. Mastrangelo, E. Francia, C. Marè, A. Tondelli and A. M. Stanca. "Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics." Field Crops Research. 2008; **105**(1): 1-14.

12.Chinnusamy, V., K. Schumaker and J. K. Zhu. "Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants." J. experimental botany. 2004; **55**(395): 225-236.

13.Dechaine, J. M., G. Gardner and C. Weinig. "Phytochromes differentially regulate seed germination responses to light quality and temperature cues during seed maturation." Plant, cell & environment. 2009; **32**(10): 1297-1309.

14.DeLong, A. "Switching the flip: protein phosphatase roles in signaling pathways." Current opinion in plant biology. 2006; **9**(5): 470-477.

15.Farooq, M., A. Wahid, N. Kobayashi, D. Fujita and S. Basra. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Sustainable agriculture, Springer**:** 2009; 153-188.

16.Fleury, D., S. Jefferies, H. Kuchel and P. Langridge. "Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat." J. experimental botany. 2010; **61**(12): 3211-3222.

17.Fowler, S. and M. F. Thomashow. "Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway." The Plant Cell . 2002; **14**(8): 1675-1690.

18.Franklin, K. A. and P. H. Quail. "Phytochrome functions in Arabidopsis development." J. experimental botany. 2010; **61**(1): 11-24.

19.Gosal, S. S., S. H. Wani and M. S. Kang. "Biotechnology and drought tolerance." J. Crop Improvement. 2009; **23**(1): 19-54.

20.Guimarães-Dias, F., A. C. Neves-Borges, A. A. B. Viana, R. O. Mesquita, E. Romano, M. d. F. Grossi-de-Sá, A. L. Nepomuceno, M. E. Loureiro and M. Alves-Ferreira. "Expression analysis in response to drought stress in soybean: Shedding light on the regulation of metabolic pathway genes." Genetics and molecular biology. 2012; **35**(1): 222-232.

21.Gürel, F., Z. N. Öztürk, C. Uçarlı and D. Rosellini. "Barley Genes as Tools to Confer Abiotic Stress Tolerance in Crops." Frontiers in Plant Science.2016; **7**.

22.Hruz, T., O. Laule, G. Szabo, F. Wessendorp, S. Bleuler, L. Oertle, P. Widmayer, W. Gruissem and P. Zimmermann. "Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes." Advances in bioinformatics **2008**.

23.James, V. A., I. Neibaur and F. Altpeter. "Stress inducible expression of the DREB1A transcription factor from xeric, Hordeum spontaneum L. in turf and forage grass (Paspalum notatum Flugge) enhances abiotic stress tolerance." Transgenic research. 2008;**17**(1): 93-104.

24.Jang, I.-C., P. J. Chung, H. Hemmes, C. Jung and N.-H. Chua. "Rapid and reversible light-mediated chromatin modifications of Arabidopsis phytochrome A locus." The Plant Cell. 2011; **23**(2): 459-470.

25.Janssens, V. and J. Goris. "Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling." Biochemical Journal.2001; **353**(3): 417-439.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 21:58 +0330 on Saturday March 17th 2018

26.Kazan, K. and R. Lyons. "The link between flowering time and stress tolerance." J. experimental botany. 2016; **67**(1): 47-60.
27.Kidokoro, S., K. Maruyama, K. Nakashima, Y. Imura, Y. Narusaka, Z. K. Shinwari, Y. Osakabe, Y. Fujita, J. Mizoi and K. Shinozaki. "The phytochrome-interacting factor PIF7 negatively regulates DREB1 expression under circadian control in Arabidopsis." Plant physiology. 2009; **151**(4): 2046-2057.
28.Knupffer, H., I. Terentyeva, K. Hammer, O. Kovaleva and K. Sato. "Ecogeographical diversityâ€"a Vavilovian appraoch." Developments in Plant Genetics and Breeding.2003; **7**: 53-76.
29.Mian, A., R. J. F. J. Oomen, S. Isayenkov, H. Sentenac, F. J. M. Maathuis and A. n. Vry. "Over expression of an Na+ and K+ permeable HKT transporter in barley improves salt tolerance." The Plant Journal. 2011; **68**(3): 468-479.
30.Mir, R. R., M. Zaman-Allah, N. Sreenivasulu, R. Trethowan and R. K. Varshney. "Integrated genomics, physiology and breeding approaches for improving drought tolerance in crops." Theoretical and Applied Genetics. 2012; **125**(4): 625-645.
31.Montes, R. A. C., G. Coello, K. L. González-Aguilera, N. Marsch-Martínez, S. de Folter and E. R. Alvarez-Buylla. "ARACNe-based inference, using curated microarray data, of Arabidopsis thaliana root transcriptional regulatory networks." BMC plant biology. 2014; **14**(1): 97.
32.Moulin, M., C. Deleu and F. Larher. "L-Lysine catabolism is osmo-regulated at the level of lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase in rapeseed leaf discs." Plant Physiology and Biochemistry.2011; **38**(7): 577-585.
33.Nevo, E. and G. Chen. "Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement." Plant, cell & environment **33**(4): 670-685.
34.Nikitin, A., S. Egorov, N. Daraselia and I. Mazo. "Pathway studio—the analysis and navigation of molecular networks." Bioinformatics. 2003; **19**(16): 2155-2157.
35.Oh, E., H. Kang, S. Yamaguchi, J. Park, D. Lee, Y. Kamiya and G. Choi. "Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during seed germination in Arabidopsis." The Plant Cell. 2009; **21**(2): 403-419.
36.Oukarroum, A., S. El Madidi, G. Schansker and R. J. Strasser. "Probing the responses of barley cultivars (Hordeum vulgare L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering." Environmental and Experimental Botany. 2007; **60**(3): 438-446.
37.Ozturk Z. Neslihan, T. V., Deyholos Michael, Michalowski Christine B,. Galbraith David W, Gozukirmizi Nermin, Tuberosa Robertoand Bohnert Hans J. "Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley." Plant Molecular Biology . 2002; **48**: 551–573.
38.Pernas, M., G. García-Casado, E. Rojo, R. Solano and J. J. Sánchez-Serrano. "A protein phosphatase 2A catalytic subunit is a negative regulator of abscisic acid signalling." The Plant Journal.2007; **51**(5): 763-778.
39.Sawada, Y., M. Aoki, K. Nakaminami, W. Mitsuhashi, K. Tatematsu, T. Kushiro, T. Koshiba, Y. Kamiya, Y. Inoue and E. Nambara. "Phytochrome-and gibberellin-mediated regulation of abscisic acid metabolism during germination of photoblastic lettuce seeds." Plant Physiology. 2008; **146**(3): 1386-1396.
40.Schilling, R. K., P. Marschner, Y. Shavrukov, B. Berger, M. Tester, S. J. Roy and D. C. Plett. "Expression of the Arabidopsis vacuolar H+ pyrophosphatase gene (AVP1) improves the shoot biomass of transgenic barley and increases grain yield in a saline field." Plant biotechnology journal. 2014; **12**(3): 378-386.

41.Schmalenbach, I., L. Zhang, M. Reymond and J. M. Jiménez-Gómez. "The relationship between flowering time and growth responses to drought in the Arabidopsis Landsberg erecta x Antwerp-1 population." Frontiers in plant science. 2013; **5**: 609-609.
42.Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki. "Gene networks involved in drought stress response and tolerance." J. experimental botany. 2007; **58**(2): 221-227.
43.Smoot Michael E. , O. K., Ruscheinski Johannes, Wang Peng-Liang ,Ideker Trey. "Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization." BIOINFORMATICS. 2011; **27**(3): 431–432.
44.Suzuki, N., R. M. Rivero, V. Shulaev, E. Blumwald and R. Mittler. "Abiotic and biotic stress combinations." New Phytologist. 2014; **203**(1): 32-43.
45.Talame Valentina, O. N. Z., Bohnert Hans J,Tuberosa Roberto,. "Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis." J. Experimental Botany. 2007; **58**(2): 229–240.
46.Toledo-Ortiz, G., E. Huq and M. Rodríguez-Concepción. "Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors." Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010; **107**(25): 11626-11631.
47.Toledo-Ortiz, G., Y. Kiryu, J. Kobayashi, Y. Oka, Y. Kim, H. G. Nam, N. Mochizuki and A. Nagatani. "Subcellular sites of the signal transduction and degradation of phytochrome A." Plant and cell physiology. 2010; **51**(10): 1648-1660.
48.Tommasini, L., J. T. Svensson, E. M. Rodriguez, A. Wahid, M. Malatrasi, K. Kato, S. Wanamaker, J. Resnik and T. J. Close. "Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of barley (Hordeum vulgare L.)." Functional & integrative genomics.2008; **8**(4): 387-405.
49.Udvardi MK, K. K., Wandrey M, Montanri O, Murray J, Andraiankaja A, Zhang J-Y, Benedito V, Hofer JMI, Cheng F, Town CD. " Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment." Plant Physiology . 2007; **144**: 538-549.

50.Urano, K., Y. Kurihara, M. Seki and K. Shinozaki. "'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses." Current opinion in plant biology. 2010; **13**(2): 132-138.
51.Wang, W., B. Vinocur and A. Altman. "Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance." Planta. 2003; **218**(1): 1-14.
52.Wehner, G., C. Balko, K. Humbeck, E. Zyprian and F. Ordon. "Expression profiling of genes involved in drought stress and leaf senescence in juvenile barley." BMC plant biology.2016; **16**(1): 3.
53.Worch Sebastian, R. K., Harshavardhan Vokkaliga T, Pietsch Christof, Korzun Viktor , Kuntze Lissy, Börner Andreas, Wobus Ulrich, S Röder Marion, Sreenivasulu Nese. "Haplotyping, linkage mapping and expression analysis of barley genes regulated by terminal drought stress influencing seed quality." BMC Plant Biology. 2011;**11**(1):10-21.
54.Xu, C., R. Jing, X. Mao, X. Jia and X. Chang. "A wheat (Triticum aestivum) protein phosphatase 2A catalytic subunit gene provides enhanced drought tolerance in tobacco." Annals of botany .2007; **99**(3): 439-450.
55.Zhang, H., X. Mao, C. Wang and R. Jing. "Overexpression of a common wheat gene TaSnRK2. 8 enhances tolerance to drought, salt and low temperature in Arabidopsis." PloS one. 2010; **5**(12): e16041.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 21:58 +0330 on Saturday March 17th 2018