

## بررسی مقایسه‌ای ترنسکرپتوم برگ برنج تحت شرایط کنترل و تنش خشکی با استفاده از داده‌های EST

منظر حیدری<sup>۱</sup>، زهرا سادات شبر<sup>۲\*</sup>، پریسا کوپاز<sup>۲</sup>، محمدجواد حیدری<sup>۳</sup>

۱. کارشناس بخش زیست‌شناسی سیستم‌ها، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

۲. استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

۳. دانشجوی دکتری کامپیوتر، دانشکده کامپیوتر، دانشگاه امیرکبیر، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۲ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۶/۲۰)

## Comparative analysis of rice leaves transcriptome under control and drought stress conditions using EST data

Manzar Heidari<sup>1</sup>, Zahra-Sadat Shobbar<sup>2\*</sup>, Parisa Koobaz<sup>2</sup>, Mohammad Javad Heydari<sup>3</sup>

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

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

3. Ph.D. Student of Computer, Department of Computer and Information Technology, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran.

(Received: Apr. 22, 2016 - Accepted: Sep. 10, 2016)

### Abstract

Rice is the staple food for more than half the world's population, especially in developing countries. Drought is the most yield-limiting factor for rice production in Asia. The current study was conducted to identify the drought stress responsive genes through EST data analysis of two rice leaves libraries. EST libraries data under normal and drought stress conditions were downloaded from NCBI databank. Preprocessing, clustering and assembly of the EST sequences were done using EGAssembler software. Generated contig and singleton sequences were used as template for BLASTx analysis against rice protein database and functional category assignment using CLC Protein Workbench software and AgriGO. The identified proteins in the normal and drought libraries were allocated to 70 and 82 functional categories, respectively. IDEG6 were used to identify significant differences between functional categories in control and drought stress libraries. Gene ontology analysis, revealed significant differences in 20 groups of molecular function, 35 groups of biological processes and 12 groups of the intracellular components. In order to find the significant differential expression between the two libraries, 4012 ESTs with unigene accession numbers were implemented through applying an algorithm by MATLAB software and were analyzed by IDEG6 software, where 42 genes were found to be differentially expressed between drought and normal conditions (31 up-regulated and 11 down-regulated genes). The up-regulated genes were involved in environmental and oxidative stress response, homeostasis, proteolysis and glycolysis, while photosynthesis related genes were down-regulated.

**Keywords:** Rice, Expressed Sequence Tag (EST), Differentially expressed genes, Drought.

### چکیده

برنج غذای اصلی بیش از نیمی از جمعیت جهان به ویژه کشورهای در حال توسعه است و خشکی مهمترین عامل کاهش عملکرد برنج در آسیا می‌باشد. این تحقیق به منظور شناسایی ژن‌های پاسخ دهنده به تنش خشکی با کمک تجزیه و تحلیل اطلاعات EST دو کتابخانه برگ برنج انجام شد. داده‌های کتابخانه‌های EST در شرایط شاهد و تنش خشکی، از پایگاه داده NCBI دریافت و با استفاده از نرم‌افزار EGAssembler ویرایش، دسته‌بندی و هم‌گذاری شدند. توالی‌های کانتیگ و سینگلتون به دست آمده به عنوان الگو برای جستجوی بلاست X در بانک توالی پروتئین برنج و انتساب گروه عملکردی با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomic Workbench و AgriGO به کار برده شدند. پروتئین‌های شناسایی شده در کتابخانه‌های شاهد و خشکی به ترتیب در ۷۰ و ۸۲ گروه کارکردی مختلف قرار گرفتند. برای شناسایی تفاوت‌های معنی‌دار بین گروه‌های کارکردی در کتابخانه‌های شاهد و تنش خشکی از نرم‌افزار IDEG6 استفاده شد. بررسی هستی‌شناسی ژن‌ها، تفاوت معنی‌دار در ۲۰ گروه عملکردهای مولکولی، ۳۵ گروه فرایندهای زیستی و ۱۲ گروه اجزای درون سلول را آشکار ساخت. به منظور تعیین بیان افتراقی ژن‌ها بین دو کتابخانه، ۴۰۱۲ EST دارای کد Unigene با استفاده از الگوریتم پیاده‌سازی شده در نرم‌افزار MATLAB انتخاب و با استفاده از نرم‌افزار IDEG6 تفاوت معنی‌دار بین ۴۲ ژن تحت تنش خشکی نسبت به شاهد، مشاهده شد (۳۱ ژن افزایش و ۱۱ ژن کاهش بیان). ژن‌های افزایش بیان یافته، در پاسخ به تنش‌های محیطی و اکسیداتیو، برقراری هموستازی، پروتئولیز و گلیکولیز نقش داشته و ژن‌های مربوط به فتوسنتز کاهش بیان نشان دادند.

**واژه‌های کلیدی:** برچسب توالی‌های بیان شده (EST)، برنج، بیان افتراقی ژن‌ها، خشکی.

## مقدمه

برنج غذای اصلی بیش از نیمی از جمعیت جهان، به ویژه کشورهای در حال توسعه است و به همراه گندم و ذرت تأمین‌کننده ۵۰ درصد کالری کل جمعیت جهان و به تنهایی ۸۰ درصد کالری اکثر مردم آسیا می‌باشد (Maclean & Dawe, 2002). خشکی مهمترین تنش غیرزیستی در آسیا است که موجب کاهش پتانسیل عملکرد برنج در این مناطق می‌شود. بنابراین تحقیقات گسترده‌ای برای اصلاح زراعی و ژنتیکی این گیاه به منظور تولید در مناطق دارای محدودیت آبی صورت گرفته است. اما همچنان فقدان اطلاعات لازم ژنتیکی در مورد ژن‌های کنترل‌کننده این صفت پیچیده احساس می‌شود. در دسترس نبودن آب کافی موجب القای سه نوع تغییر در گیاهان به منظور ایجاد تحمل به خشکی می‌شود: ۱- تغییر در بیان ژن‌ها (Batlang *et al.*, 2013)، ۲- تولید پروتئین‌ها و تجزیه آن‌ها (Mohammadi *et al.*, 2012)، ۳- تغییر در منابع متابولیکی آن‌ها (Kumari *et al.*, 2013). با استفاده از فن‌آوری‌های امیکس شامل ژنومیکس، ترانسکریپتومیکس<sup>۱</sup>، پروتئومیکس<sup>۲</sup> و متابولومیکس<sup>۳</sup> می‌توان به ترتیب، توالی‌های کل ژنوم، رونوشت‌های RNA، پروتئین‌ها و متابولیت‌ها را در سطح ژنوم بررسی نمود (Fleury *et al.*, 2010). ژنومیکس کارکردی<sup>۴</sup>، با روش‌هایی نظیر تولید، تجزیه و تحلیل توالی‌های EST<sup>۵</sup>، تکنولوژی ریزآرایه<sup>۶</sup>، توالی‌یابی RNA<sup>۷</sup> یا RNA-seq، امکان بررسی بیان و مطالعه رونوشت‌های ژنی درگیر در شبکه‌های تنظیمی و متابولیکی را فراهم آورده‌اند (Ali *et al.*, 2011). در حال حاضر تعداد قابل توجهی از ژن‌ها، محصولات ژن‌ها و مسیرهای

مرتبط با پاسخ به تنش خشکی با استفاده از بررسی پروفایل بیان همانند: ریزآرایه، EST، تجزیه و تحلیل ژل پلات<sup>۸</sup>، RNA و qRT-PCR در برنج شناسایی شده است (Cheah *et al.*, 2015; Degenkolbe *et al.*, 2009; Ramamoorthy *et al.*, 2008).

ساده‌ترین راه برای دستیابی به اطلاعات کارکردی و ساختاری یک ژن، داشتن توالی‌های مشخص و مقایسه‌ی بین آن‌ها و داده‌های قبلی است. ESTها منابع غنی از اطلاعات برای تحقیقات ژنتیکی نظیر بررسی بیان ژن، استنتاج ساختار ژن، کشف و تشریح ماهیت ژن هستند. از کاربردهای ESTها می‌توان به شناسایی خانواده‌های ژنی حفاظت شده بین گونه‌های مورد بررسی و تعیین ساختار ژن از طریق صف‌بندی<sup>۹</sup> و انطباق ویرایش‌ها، بررسی بیان ژن و تفسیر ژنوم اشاره کرد (Dong, 2005). همچنین در مواردی که توالی ژنومی یک موجود به شکل کامل مشخص نشده است، کتابخانه‌های cDNA و EST تنها رابط معتبر و جامع ژنوم باقی می‌مانند (Xoconostle-Cazares *et al.*, 2010). بر اساس اهمیت و کارایی، از ESTها به عنوان یک روش ارائه مستقیم برای کشف ژن‌های مرتبط با پاسخ به تنش استفاده و مجموعه زیادی از آنها در گیاهان تحت تنش خشکی از جمله گندم برنج و جو گزارش شده است (Manickavelu *et al.*, 2012; Gorantla *et al.*, 2011; Szira *et al.*, 2005). داده‌های خام پایگاه داده‌های مختلف همچون NCBI، TGI، PlandGDB به دست آورد. وجود این منابع غنی اطلاعات و در دسترس بودن سرویس‌ها و نرم‌افزارهای مختلف بیوانفورماتیک راه را برای مطالعه و بررسی تغییرات ژنومی هموار نموده است (Ogata & Suzuki, 2011). مطالعه روی ESTهای مشترک بین برگ و پانیکول، در گیاه برنج

1. Transcriptomics
2. Proteomics
3. Metabolomics
4. Functional genomics
5. Expressed Sequenced Tags
6. Microarray
7. RNA-sequencing

8. Gel Plot
9. Alignment

### گروه‌های کارکردی<sup>۳</sup>

به‌منظور شناسایی آلودگی‌های وکتوری، بررسی طول و کیفیت، توالی‌های EST مربوط به هر کدام از کتابخانه‌ها به صورت جداگانه با استفاده از سرویس بیوانفورماتیک Egassembler<sup>۴</sup> مورد بررسی قرار گرفتند (Masoudi-Nejad *et al.*, 2006). توالی‌های مربوط به وکتور، توالی‌های تکرار شونده و با طول کوتاه‌تر از ۱۰۰ جفت باز حذف شدند. در ادامه توالی‌های دارای ۹۵ درصد همانندی، وپرایش، دسته‌بندی<sup>۵</sup> و هم‌گذاری<sup>۶</sup> شدند. خروجی این نرم‌افزار شامل کانتیگ‌ها (دو یا تعداد بیشتری EST)، سینگلتن‌ها (تنها یک EST) و فایل صف‌بندی توالی‌های EST است. به منظور تعیین پروتیین مرتبط با هر توالی، توالی‌های کانتیگ و سینگلتن هر کتابخانه با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 5.1 به صورت Local با بانک توالی پروتیین گیاه برنج که از پایگاه‌داده Rap-db بارگیری شد، بلاست ایکس شدند. سپس گروه‌های کارکردی مربوط به پروتیین‌های هر کتابخانه با استفاده از ابزار بیوانفورماتیک تحت وب AgriGO با استفاده از آزمون آماری Fisher در سطح پنج درصد، با در نظر گرفتن آستانه  $E \leq 10E^{-5}$  مشخص شدند. تعیین گروه‌های کارکردی تنها تعداد و درصد توالی‌های اختصاص داده شده به گروه‌های مجزای کارکردی را مشخص می‌نماید و این مقادیر به تنهایی نمی‌توانند بیانگر وجود اختلاف کارکردی بین کتابخانه‌ها باشند. بنابراین مقایسه و انجام آزمون آماری مناسب می‌تواند اختلاف کارکردی بین آن‌ها را نمایان سازد. بدین منظور با استفاده از نرم‌افزار تحت وب IDEG6<sup>۱۰</sup> و آزمون آماری Audic & Claverie گروه‌های کارکردی با پنج درصد اختلاف معنی‌دار مشخص شدند.

تحت تنش خشکی، در مقایسه با گیاه آرابیدوپسیس، ۱۲۵ ژن مشترک مؤثر در تحمل به تنش خشکی را نشان داد (Nagaraj *et al.*, 2007). مقایسه منابع EST بین گیاهان برنج، گندم، فستوکا و پنبه تحت تنش خشکی در مقایسه با بانک توالی گیاه آرابیدوپسیس انجام شد (Heidari *et al.*, 2013). اما در هیچ یک از مقایسات انجام شده نمونه‌های کنترل وجود نداشته و تنها نمونه‌های تنش با منابع اطلاعاتی موجود از آرابیدوپسیس مورد مقایسه قرار گرفته‌اند. به همین منظور این پژوهش در راستای تعیین گروه‌های کارکردی<sup>۱</sup> پروتیین‌ها، بررسی تغییرات بیان ژن‌ها و شناسایی سیستماتیک ژن‌های دخیل و پاسخ‌گو به تنش خشکی در شرایط کنترل و تنش خشکی، در مقایسه با منابع اطلاعاتی موجود از گیاه برنج، به وسیله‌ی ابزارهای بیوانفورماتیک انجام شده است. با استفاده از EST‌های موجود در پایگاه‌داده‌ها و تجزیه و تحلیل آن‌ها در شرایط کنترل و تنش خشکی، شناسایی جامع و دقیق‌تر ژن‌های دخیل در پاسخ به این تنش امکان‌پذیر می‌شود و با بررسی عملکرد این ژن‌ها می‌توان به نقش مؤثر آن‌ها در روند متابولیسم و فیزیولوژیکی برنج پی برد.

### مواد و روش‌ها

#### انتخاب کتابخانه‌های EST

در دستیابی به گروه‌های کارکردی و نقش سلولی EST، دو کتابخانه کنترل و تنش خشکی که بیشترین شباهت را از نظر شرایط آزمایشی (بافت، زیرگونه، دوره رویشی) داشتند از پایگاه داده NCBI<sup>۲</sup> انتخاب و توالی‌های مربوط با فرمت FASTA دانلود شدند (جدول ۱). رقم مورد مطالعه در کتابخانه تحت تنش خشکی (Nagina22) جزو ارقام متحمل به تنش خشکی است (Gorantla *et al.*, 2007).

3. Functional categories  
4. <http://www.genome.jp/tools/egassembler/>  
5. Clustering  
6. Assembling  
7. <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>  
8. Blastx  
9. <http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>  
10. <http://telethon.bio.unipd.it/bioinfo/IDEG6/>

1. Gene Ontology Annotation (GO)  
2. National Center for Biotechnology Information

جدول ۱. داده‌های مورد استفاده در تحقیق

تیمار	تعداد EST	رقم	زیر گونه	بافت	گیاه	شناسه کتابخانه
کنترل	7074	PA64s	Indica	برگ	برنج	14615
تنش خشکی	5724	Nagina 22	Indica	برگ	برنج	9652

برابر بانک پروتیینی گیاه برنج با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench version 5.1 نشان داد که ۹۲/۶۵ درصد کل توالی‌های EST کتابخانه کنترل و ۸۲/۰۲ درصد کل توالی‌های EST کتابخانه تحت تنش خشکی، درون کانتیگ‌ها قرار گرفتند. حدود ۹۳/۹۲ درصد از دسته‌های (مجموع کانتیگ و سینگلتن) کتابخانه تحت شرایط کنترل و ۹۰/۸۵ درصد از دسته‌های کتابخانه تحت تنش خشکی با پروتیین‌های شناخته شده در گیاه برنج شباهت نشان دادند ( $Evalue \leq 10E^{-5}$ ) (جدول ۲).

#### تعیین گروه‌های کارکردی

گروه‌های کارکردی مربوط به هر کتابخانه با استفاده از ابزار بیوانفورماتیکی AgriGO تعیین شدند. دسته‌های دارای Hit کتابخانه برنج تحت شرایط کنترل و تنش خشکی با  $Evalue \leq 10E^{-5}$  به ترتیب در ۷۰ و ۸۲ گروه کارکردی مختلف قرار گرفتند. مقایسه هر یک از اجزای هستی‌شناسی<sup>۱</sup> (عملکردهای مولکولی ۲۰ گروه، فرایندهای زیستی ۳۵ گروه و اجزای داخلی سلول ۱۲ گروه) بین دو کتابخانه مذکور در شکل یک نمایش داده شده است. مقایسه هستی‌شناسی در سطح فرایندهای زیستی نشان داد که پنج گروه کارکردی در شرایط تنش نسبت به کنترل افزایش (برای مثال فرایندهای هموستازی، فرایندهای متابولیکی پروتیین، تنظیم کیفی در فرایندهای زیستی و فرایند ترجمه) و ۲۳ گروه کاهش معنی‌داری (برای مثال فرایندهای متابولیکی در سطح DNA) نشان دادند (شکل ۱-الف). افزایش فرایندهای هموستازی تحت تنش خشکی بیانگر تحمل بیشتر گیاه نسبت به شرایط

#### بررسی افتراقی بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار IDEG6

مبنای بررسی و مقایسه بیان ژن‌ها در شرایط کنترل و تنش خشکی، تعداد رونوشت‌های هر ژن در هر کدام از کتابخانه‌ها می‌باشد. با استفاده از الگوریتم پیاده‌سازی شده توسط نرم‌افزار متلب<sup>۱</sup>، EST‌های دارای کد Unigene انتخاب و بیان افتراقی ژن‌های دو کتابخانه مذکور، توسط نرم‌افزار IDEG6 با استفاده از آزمون آماری Audic & Claverie در سطح پنج درصد انجام شد. به منظور تعیین گروه‌های کارکردی ژن‌های دارای اختلاف معنی‌دار از پایگاه داده‌های Uniprot، PSORT<sup>۲</sup> و ابزار بیوانفورماتیکی AgriGO استفاده شد.

#### نتایج و بحث

##### آنالیز توالی‌های EST

بررسی هم‌ردیفی توالی‌های EST با استفاده از ابزار بیوانفورماتیکی EGassembler انجام شد که در کتابخانه کنترل از هم‌گذاری ۷۰۷۴ توالی، ۶۸۱ کانتیگ و ۲۴۱۱ سینگلتن و در کتابخانه تحت تنش خشکی از هم‌گذاری ۵۷۲۴ توالی، ۵۹۹ کانتیگ و ۹۲۹ سینگلتن به دست آمد ( $Evalue \leq 10E^{-5}$ ). تعداد کانتیگ و سینگلتن‌های به دست آمده در شرایط تنش در مقایسه با نتایج به دست آمده از Gorantla و همکاران کاهش یافته است (Gorantla et al., 2007). نتایج به دست آمده از جستجوی بلاست ایکس به صورت Local برای کانتیگ‌ها و سینگلتن‌های دو کتابخانه مذکور، در

1. Matlab  
2.

بین ۴۲ ژن را نشان داد. از این تعداد، ۳۱ ژن افزایش و ۱۱ ژن کاهش بیان معنی‌داری تحت تنش خشکی نسبت به کنترل داشتند. در شرایط کنترل و تنش خشکی به ترتیب، تنها بیان ۴ و ۱۶ ژن مشاهده شد. همچنین ۱۵ ژن تحت تنش خشکی افزایش بیان و ۷ ژن کاهش بیان نشان دادند. مطالعات انجام شده با استفاده از مقایسه داده‌های متاآنالیز ریزآرایه‌ها در گیاهان برنج، گندم، جو و آرابیدوپسیس تحت تنش خشکی نیز نشان داد که بیشتر ژن‌ها، تحت تنش خشکی افزایش بیان داشته و در ژن‌های فتوسنتزی بیشترین کاهش بیان تحت تنش خشکی مشاهده شد ( Shaar-Moshe *et al.*, 2015).

#### گروه‌های کارکردی ژن‌های دارای بیان افتراقی

از ۴۲ ژن دارای شناسه Unigene، برای ۳۷ ژن شناسه Uniprot گزارش شده است و AgriGO برای ۳۱ عدد از این ژن‌ها گروه کارکردی گزارش نمود (شکل‌های ۲، ۳ و ۴). ژن‌های افزایش بیان یافته در پاسخ به تنش‌های محیطی و اکسیداتیو، برقراری هموستازی، پروتئازها و گلیکولیز مؤثر هستند و ژن‌های کاهش بیان یافته متعلق به دستگاه فتوسنتزی می‌باشند (جدول ۳). در ادامه به بحث در مورد تعدادی از این پروتیین‌ها و نحوه دخالت آن‌ها در پاسخ به تنش خشکی پرداخته شده است.

تنش به منظور حفظ فرایندهای مهم زیستی از جمله متابولیسم و تولید انرژی می‌باشد ( Zhou *et al.*, 2007). در سطح عملکرد مولکولی به ترتیب ۳ و ۱۰ گروه کارکردی افزایش و کاهش معنی‌داری نسبت به کنترل نشان دادند و هفت گروه کارکردی هیچ نماینده‌ای در شرایط کنترل نداشتند (شکل ۱-ب). در سطح اجزای داخلی سلول نسبت به شرایط کنترل ۶ گروه کارکردی کاهش نشان دادند و پنج و یک گروه کارکردی به ترتیب هیچ نماینده‌ای در شرایط کنترل و تنش خشکی نداشتند (شکل ۱-ج).

#### بررسی افتراقی بیان ژن‌ها

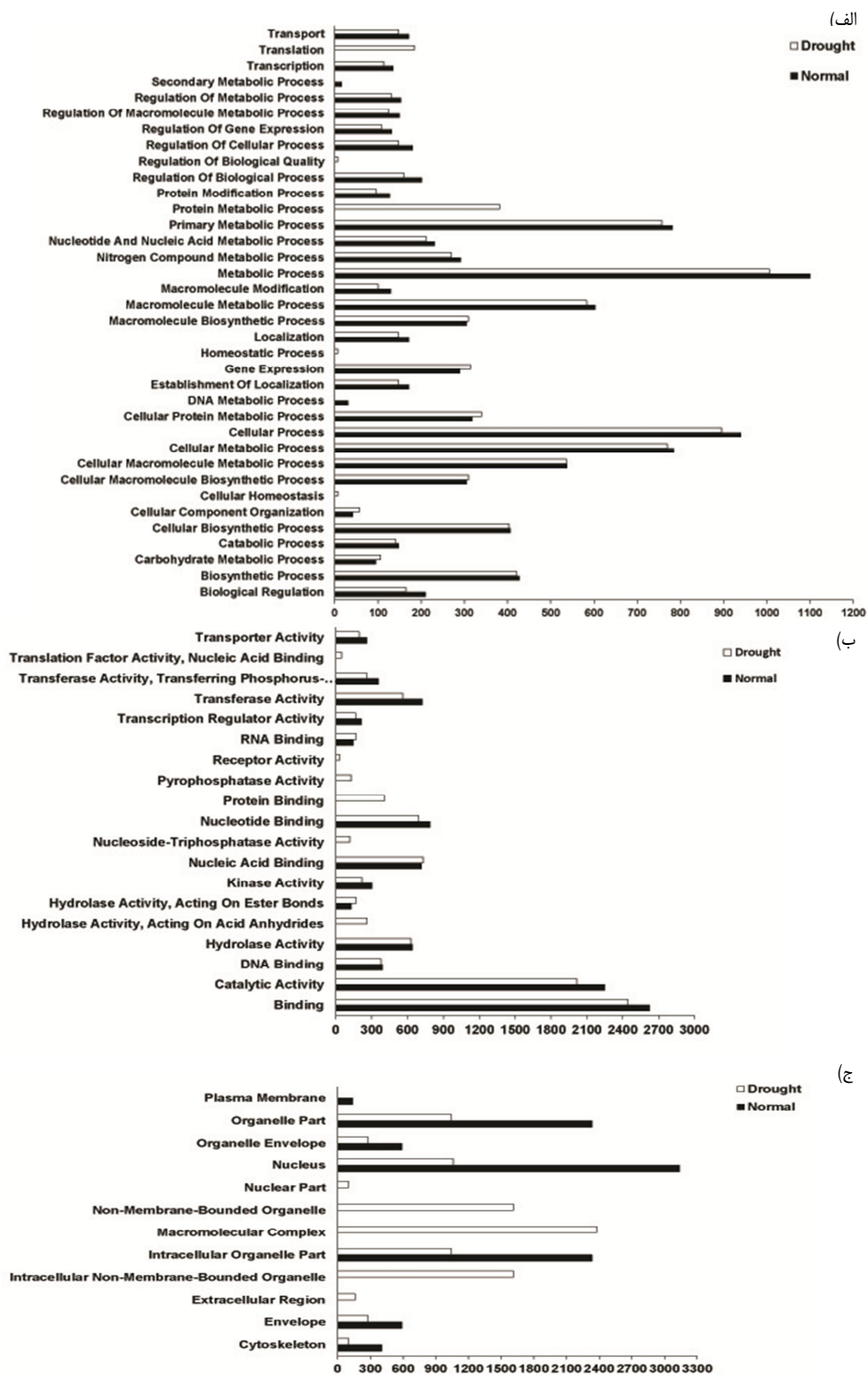
به‌منظور یافتن ژن‌های دارای بیان افتراقی، یک مبنای مقایسه واحد مورد نیاز است چرا که بعد از هم‌گذاری EST‌های هر کتابخانه، کانتیگ‌ها و سینگلتون‌های حاصل شماره‌های انتزاعی دارند و مقایسه بیان ژن‌ها بین دو کتابخانه امکان‌پذیر نیست. بدین منظور با استفاده از الگوریتم پیاده‌سازی شده توسط نرم‌افزار متلب از مجموع ۱۲۷۹۸ توالی EST مربوط به دو کتابخانه کنترل و تنش خشکی، ۱۰۴۱۲ توالی دارای شناسه Unigene و ۲۳۸۶ توالی فاقد شناسه Unigene شناسایی شدند. آنالیز آماری Audic & Claverie در توالی‌های دارای شناسه Unigene با استفاده از نرم‌افزار IDEG6 تفاوت بیان معنی‌داری در سطح پنج درصد

جدول ۲. اطلاعات دسته‌بندی و هم‌گذاری توالی‌های EST و بلاست کانتیگ‌ها و سینگلتون‌ها در دو کتابخانه برنج تحت شرایط کنترل

#### و تنش خشکی

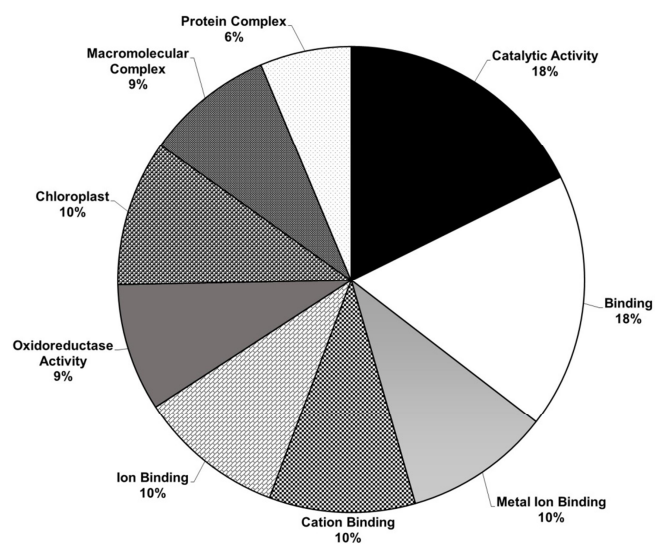
تیمار	تعداد EST	تعداد دسته* با $Evalue \leq 10E^{-5}$	تعداد کانتیگ		تعداد سینگلتون		کل دسته‌های دارای Hit با $Evalue \leq 10E^{-5}$	کل دسته‌های بدون Hit
			بدون Hit	دارای Hit**	بدون Hit	دارای Hit		
کنترل	7074	3092	4	677	184	2227	188	2904
تنش خشکی	5724	1628	16	583	132	897	148	1479

\* مجموع کانتیگ و سینگلتون. \*\* دارای مشابهت ( $Evalue \leq 10E^{-5}$ ) با پروتیین‌های شناخته شده در گیاه برنج.

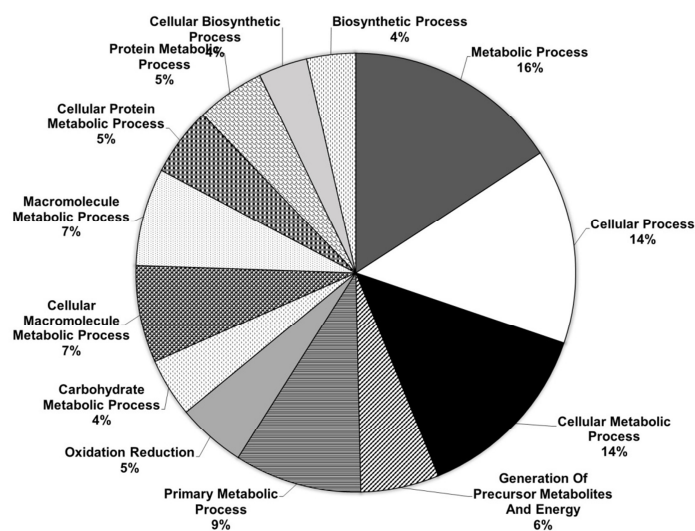


شکل ۱. بررسی هستی‌شناسی بین گروه‌های کارکردی متفاوت (معنی‌دار در سطح ۵٪) بین دو کتابخانه کنترل و تنش خشکی. (الف) عملکردهای مولکولی، (ب) فرایندهای زیستی، (ج) اجزای داخلی سلول.

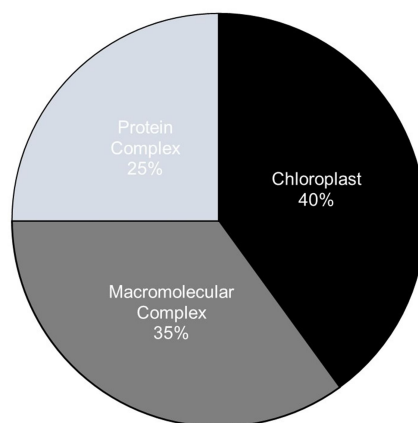
حیدری و همکاران: بررسی مقایسه‌ای ترنسکریپتوم برگ برنج تحت ...



شکل ۲. عملکردهای مولکولی مربوط به ژن دارای تفاوت بیان معنی‌دار در سطح پنج درصد.



شکل ۳. فرایندهای زیستی مربوط به ژن دارای تفاوت بیان معنی‌دار در سطح پنج درصد.



شکل ۴. اجزای داخل سلولی مربوط به ژن دارای تفاوت بیان معنی‌دار در سطح پنج درصد.

متالوتیونین<sup>۱</sup>

در گیاهان براساس توالی اسیدهای آمینه به چهار تیپ تقسیم می‌شوند، تیپ اول بیشتر در ریشه‌ها، دوم در برگ‌ها، سوم در میوه‌های رسیده و چهارم در بذرها در حال رشد بیان شده و با حذف رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در تحمل به تنش خشکی ایفا می‌کنند (Cobbett & Goldsbrough, 2002). البته هنوز سازوکار مشخصی از نحوه جاروب‌کنندگی ROSها<sup>۲</sup> توسط متالوتیونین گزارش نشده است. وجود یک فرضیه نشان می‌دهد که متالوتیونین‌ها یا مستقل از سوپراکسیددسموتازها (SOD) یا به عنوان فعال‌کننده آن‌ها (با فراهم نمودن فلزات مورد نیاز از جمله مس و روی) در غیر فعال کردن رادیکال‌های آزاد نقش دارند. در گیاه برنج تنش‌های غیرزیستی باعث افزایش یون روی و در نتیجه تحریک متالوتیونین‌ها می‌شود. این تحریک می‌تواند به صورت مستقیم، از طریق تأثیر بر روی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و یا با افزایش میزان جذب روی و تحریک زینک فینگرهای مسئول نسخه‌برداری، موجب غیرفعال شدن ROSها و در نتیجه تحمل به تنش شود (Yang et al., 2009). وجود دو تیپ ژن از خانواده متالوتیونین‌ها در ریشه و گیاهچه برنج گزارش شده است (Zhou et al., 2005). بیان این پروتیین‌ها در برگ و ریشه گیاه برنج تحت تنش‌های غیرزیستی (شوری، خشکی و فلزات سنگین) القاء می‌شود. همچنین در نمو بذر (Brkljacic et al., 2004)، پیری برگ (Navabpour et al., 2003) و جلوگیری از زیان‌های ناشی از تنش‌های اکسیداتیو به عنوان پروتکتانت عمل می‌کنند (Gautam et al., 2012). مطالعه حاضر نیز افزایش بیان متالوتیونین‌های نوع 2b، 2c و 3a را تحت تنش خشکی نشان داده است (جدول ۳).

تیوردوکسین<sup>۳</sup>

در گیاهان سه سیستم تیوردوکسینی وجود دارد: تیوردوکسین کلروپلاستی، سیتوسولیک و میتوکندریایی. تیوردوکسین‌های کلروپلاستی از طریق فردوکسین‌ها احیاء می‌شوند اما تیوردوکسین‌های سیتوسولیک و میتوکندریایی به وسیله نیکوتین آمیدآدنین دی‌نوکلئوتید فسفات‌ها (NADPH) احیا می‌شوند. در پاره‌ای از فرایندهای بیوشیمیایی شامل به حرکت درآوردن پروتیین و نشاسته در بذر غلات هنگام جوانه‌زنی، خونداسازگاری و محافظت سلول در برابر تنش اکسیداتیو، به‌خصوص در زمان کاهش آب درون سلول در دانه و جوانه‌زنی بذر، دخیل می‌باشند (Serrato & Cejudo, 2003). تیوردوکسین h موجب احیای انواع پروتیین‌های دارای پیوند دی‌سولفید از جمله پروتیین‌های ذخیره‌ای مانند گلوٹینین<sup>۴</sup> و گلاڈین<sup>۵</sup> در گندم (Kobrehel et al., 1992; Lozano et al., 1996)، هوردیین<sup>۱</sup> و گلوٹلین<sup>۲</sup> در جو (Marx et al., 2003) و پروتیین‌های مرتبط با تنش‌های اکسیداتیو (پراکسی ردوکسین<sup>۳</sup>) می‌شود (Buchanan & Balmer, 2005).

بر اساس تحقیقات پروتئومیکس و وسترن‌بلات تحت تنش خشکی، افزایش برخی از انواع تیوردوکسین h در رقم متحمل به تنش خشکی در گیاه گندم گزارش شده است (Hajheidari et al., 2007). در این تحقیق نیز در رقم متحمل به تنش خشکی افزایش بیان تیوردوکسین h و دی‌سولفید ایزومراز مشاهده شد (جدول ۳).

3. Thioredoxin  
4. Glutenin  
5. Gliadin

1. Metallothionein  
2. Scavenging Reactive oxygen species



جدول ۳.۴. ژن که تحت تنش خشکی تفاوت بیان معنی‌دار در سطح پنج درصد نشان دادند.

Unigene ID	Protein Name	No. of EST in Normal (norm)	No. of EST in Drought (norm)	Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
Os.88094	Ribosomal Protein	0	28.9	Translation	Structural Constituent Of Ribosome	Chloroplast Stroma
Os.81594	Burp Domain-Containing Protein 6	0	120.4	No Report	No Report	Cytoplasm
Os.81593	Predicted (CAE04594.2)	0	38.5	No Report	No Report	Micro body
Os.79636	Non-Specific Lipid-Transfer Protein 3	0	31.3	Defense Response; Lipid Transport	Lipid Binding	Plasma Membrane
Os.79190	Putative Chlorophyll A/B-Binding Protein 3c	79.9	2.4	Photosynthesis	Metal ion binding	Chloroplast
Os.79136	Chlorophyll A-B Binding Protein 2, Chloroplastic	76.7	4.8	Photosynthesis	chlorophyll binding; Metal Ion Binding	Chloroplast
Os.7902	Putative EF-Hand Ca2+-Binding Protein CCD1	1.6	45.8	No Report	Calcium Ion Binding	Cytoplasm
Os.74845	Metallothionein-Like Protein/2c	4.8	98.7	No Report	Metal Ion Binding	Cytoplasm
Os.74753	Putative; Ubiquinol-Cytochrome C Reductase	1.6	40.9	Transport	ubiquinol-cytochrome-c reductase activity	Mitochondrion
Os.59407	Glycosylhydrolase Family 3 N Terminal Domain Containing Protein	0	38.5	Carbohydrate Metabolic Process	Hydrolase Activity	Plasma Membrane
Os.58420	Q7xm4*	0	65	No Report	No Report	Cytoplasm
Os.5618	Thioredoxin- Protein Disulfide Isomerase	0	48.2	Cell Redox Homeostasis, Glycerol Ether Metabolic Process, Protein Folding	protein disulfide isomerase activity	Extracellular Region
Os.5446	Q7xre7*	1.6	52.1	No Report	No Report	Plasma Membrane
Os.4726	Ribosomal Protein S19p Family	0	38.5	Translation	RNA binding	Nucleus
Os.46772	Skp1-Like Protein 1b, Putative	3.2	125.2	Ubiquitin-Dependent Protein Catabolic Process	No Report	Cytoplasm
Os.46359	Anonymous	1.6	52.1	No Report	No Report	No Report
Os.39671	Metallothionein- Like Protein 3a	27.2	96.3	No Report	Metal Ion Binding	Microbody
Os.39054	Thioredoxin H-Type	4.8	125.2	Cell Redox Homeostasis; Glycerol Ether Metabolic Process; Intercellular Transport; Response To Cold; Response To Oxidative Stress	Electron Carrier Activity; Enzyme Inhibitor Activity; Protein Disulfide Oxidoreductase Activity	Cytoplasm
Os.37562	Chlorophyll A-B Binding Protein	52.7	2.4	Photosynthesis	Metal Ion Binding	Chloroplast
Os.35273	Putative Chlorophyll A-B Binding Protein Of Lhcii Type Iii, Chloroplast (Cab)	41.5	0	Photosynthesis	Metal Ion Binding; Structural Molecule Activity	Chloroplast Thylakoid Membrane
Os.28203	Q7x8a1* (Osjnba0036b21.24 Protein)	39.9	0	Glucose Metabolic, Response To Light Stimulus & To Cold	NAD Binding; NADP Binding; Oxidoreductase Activity	Chloroplast Stroma
Os.28030	Q0d9v4* (Os06g0696400 Protein)	0	38.5	Cellular Glucan Response To Heat & Cold; Xyloglucan Metabolic Process	Hydrolase Activity, Xyloglucan:Xyloglucosyl Transferase Activity	Apoplast; Cell Wall/ Plasma Membrane
Os.22824	Putative Xyloglucan Endo-1,4-Beta-D-Glucanase	0	28.9	Cellular Glucan Metabolic Process;	Hydrolase Activity, Hydrolyzing O-Glycosyl Compounds; Xyloglucan:Xyloglucosyl Transferase Activity	Apoplast; Cell Wall/ Plasma Membrane
Os.22816	Small Nuclear Ribonucleoprotein-Associated Protein	0	36.1	No Report	RNA Binding	Nucleus; Cytoplasm
Os.22440	Ribulosebisphosphate Carboxylase Small Chain, Chloroplastic	325.9	149.3	Photorespiration; Reductive Pentose-Phosphate Cycle;	Monoxygenase Activity; Ribulose-Bisphosphate Carboxylase Activity	Chloroplast
Os.20927	Ribulosebisphosphate Carboxylase Small Chain	241.3	31.3	Carbon Fixation; Photorespiration; Photosynthesis	Monoxygenase Activity ; Ribulose-Bisphosphate Carboxylase Activity	Chloroplast
Os.20391	Metallothionein- Like Protein 2b	6.4	216.7	Metal Ion Binding	No Report	Cytoplasm
Os.15917	Nadph Oxidoreductase	1.6	48.2	Oxidation-Reduction Process	Oxidoreductase Activity, Zinc Ion Binding	Plasmodesma
Os.15901	Otu-Like Cysteine Protease	0	36.1	Proteolysis	Peptidase Activity	Cytoplasm

1. Hordein
2. Glutelin
3. Peroxiredoxin

ادامه جدول ۳.۴۲ ژن که تحت تنش خشکی تفاوت بیان معنی‌دار در سطح پنج درصد نشان دادند.

Unigene ID	Protein Name	No. of EST in Normal (norm)	No. of EST in Drought (norm)	Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
Os.15894	Putative Peroxidase	3.2	55.4	Response To Oxidative Stress	Heme Binding; Metal Ion Binding; Peroxidase Activity	Mitochondrial Inner Membrane
Os.15850	Anonymous	0	31.3	No Report	No Report	No Report
Os.15625	Ribulose Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Activase, Chloroplastic	113.4	21.7	No Report	Nucleotide Binding ; ATP Binding	Chloroplast Stroma/ Cytoplasm
Os.14506	Triosephosphateisomerase,	4.8	86.7	Cellular Carbohydrate Metabolic Process; Glycolysis; Response To Cadmium Ion; To Salt Stress & To Zinc Ion	Triose-Phosphate Isomerase Activity; Copper Ion Binding;	Apoplast, Cell Wall, Chloroplast Mitochondrion, Plasma Membrane; Vacuole
Os.12729	Malate Dehydrogenase	0	36.1	Cellular Carbohydrate Metabolic Process; Defense Response To Bacterium; Malate Metabolic Process, Response To Cadmium Ion, To Cold To Salt Stress; Tricarboxylic Acid Cycle	L-Malate Dehydrogenase Activity; Copper Ion Binding;	Apoplast, Cell Wall, Chloroplast, Membrane, Mitochondrion
Os.12296	Chlorophylla-B Binding Protein, Chloroplastic	102.3	12	Photosynthesis, Light Harvesting; Protein-Chromophore Linkage; Response To Blue Light; To Far Red Light; To Red Light	Chlorophyll Binding; Metal Ion Binding;	Chloroplast
Os.12178	Peptidyl-Prolylcis-Trans Isomerase	0	52.1	Protein Folding	FK506 Binding; Peptidyl-Prolyl cis-Trans Isomerase Activity	Membrane
Os.12127	Putative Photosystem I Reaction Center Subunit V	36.7	0	Photosynthesis	Chlorophyll Binding	Chloroplast
Os.11473	Phosphoenolpyruvate Carboxylase Kinase	1.6	38.5	Cellular Response To Phosphate Starvation	Atp Binding, Protein Serine/Threonine Kinase Activity	Mitochondrial Intermembrane Space
Os.10313	Q0E032*( Hypothetical Protein)	1.6	115.6	No Report	No Report	Plasma Membrane
Os.10136	Photosystem I Reaction Center Subunit Vi, Chloroplastic	39.9	0	Photosynthesis	No Report ;LHC I antenna Complex To The Core Complex.(Function)	Chloroplast
Os.100087	Anonymous	1.6	36.1	No Report	No Report	No Report
Os.91760	Transcribed Locus, Weakly Similar To NP_001033958.1	0	45.8	No Report	No Report	No Report

\*چون نام پروتیین گزارش نشده، شناسه Uniprot گذاشته شده است.

### تریوز فسفات ایزومراز (TPI)

این آنزیم، در گلیکولیز مؤثر بوده و برای تولید انرژی مفید ضروری می‌باشد. این آنزیم موجب کاتالیز دی‌هیدروکسی‌استن و تبدیل آن به گلیسرآلدئید فسفات می‌شود که از جمله واکنش‌های گلیکولیزی است. علاوه بر گلیکولیز، این واکنش تقریباً اتصال‌دهنده کلیه مسیرهای حاوی تریوز فسفات در

گیاهان از جمله گلیکوژن‌نوژنز، بیوسنتز اسیدهای چرب، مسیر پنتوز فسفات و تثبیت دی‌اکسید کربن فتوسنتزی می‌باشد (Xu *et al.*, 1993). تریوز فسفات ایزومراز بر اساس شواهد به‌دست آمده از 2DE تحت تنش خشکی در گیاه برنج و ذرت به منظور حفظ هموستازی القاء می‌شود، زیرا گیاهان به سازوکارهای افزایش تحمل مانند حمل و نقل یون، مهار گونه‌های فعال اکسیژن و سنتز اسمولیت نیاز دارند (Salekdeh *et al.*, 2002). در مطالعه حاضر

1. Triosephosphate Isomerase

لیپیدترانسفراز در رقم متحمل به تنش خشکی در گیاه برنج مورد مطالعه مشاهده شد (جدول ۳).

### پراکسیداز<sup>۲</sup>

خانواده بزرگی از آنزیم‌ها هستند که در انتقالات الکترون و احیای رادیکال‌های آزاد نقش دارند. تنش خشکی باعث افزایش رادیکال‌های آزاد، القا ROSها و در نتیجه موجب پراکسیداسیون چربی، دناتوره شدن پروتئین‌ها، تخریب اسیدهای نوکلئیک و به طور کلی موجب اختلال در واکنش‌های متابولسمی می‌شود. خاموش شدن ROSها می‌تواند از طریق مولکول‌های آنتی‌اکسیدان انجام شده یا توسط آنزیم‌های اکسنده مانند پراکسیداز (POX) صورت گیرد (Caverzan *et al.*, 2012). پراکسیداز یکی از آنزیم‌های خاموش کننده  $H_2O_2$  است که در گیاهان عالی، جلبک‌ها و برخی از سیانوباکترها در کلروپلاست، میکروبادی، میتوکندری و سیتوسول دیده شده است (Asada, 1992). برخی از محققین افزایش بیان پراکسیداز را در پاسخ به تنش‌های زیستی و محیطی از جمله خشکی، شوری، نور شدید، سرما، تابش UV، ازن، گاز دی‌اکسید گوگرد ( $SO_2$ ) زخم و حمله پاتوژن‌ها گزارش کرده‌اند (Karpinski *et al.*, 1997).

بررسی بیان انواع ایزوزیم‌های آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) در گیاه برنج تحت تنش خشکی افزایش بیان آن را در گیاهچه‌های ۱۱ روزه نشان داد (Rosa *et al.*, 2010). بررسی تاثیر تنش خشکی بر روی وارپته‌های با سطوح پلوئیدی مختلف گندم (دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید) نشان داد که تنش خشکی موجب افزایش پراکسیدازها در همه وارپته‌ها به‌ویژه هگزاپلوئیدها می‌شود (Zhang & Kirkham, 1994). آنزیم پراکسیداز می‌تواند به عنوان مهمترین آنزیم جهت افزایش تحمل گیاه جو در مقابل تنش اکسنده ناشی از پیری و خشکی فعالیت نماید (Amini

نیز افزایش بیان این ژن تحت تنش خشکی مشاهده شد (جدول ۳). از آن‌جا که یکی از نقش‌های این آنزیم برقراری هموستازی از طریق تعادل یونی است، افزایش گروه کارکردی هموستازی در گیاه تحت تنش نسبت به کنترل می‌تواند تأییدکننده نقش‌های نسبت داده شده به این آنزیم باشد (Orosz, 2006).

### لیپیدترانسفراز<sup>۱</sup>

لیپیدترانسفرازها پروتئین‌هایی کوچک، ضروری و فراوان در گیاهان عالی می‌باشند که در بسیاری از گیاهان زراعی و تحقیقاتی از جمله پنبه (Ma *et al.*, 1995)، برنج، ذرت، گندم، جو، لوبیا، گوجه‌فرنگی، هلو، زردآلو و آرابیدوپسیس مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Stewart, 2000)، دارای یک سیگنال پپتیدی در دیواره سلولی بوده و با اتصال به اسیدهای چرب باعث انتقال فسفولیپیدها بین غشاء می‌شوند (Aronde *et al.*, 2000). همچنین موجب تسهیل حرکت گلیکولیپیدها بین غشاها در دو جهت داخل و خارج سلول شده و در تشکیل غشاء، تغییر ترکیب چربی‌های غشاء، جنین‌زایی و عملکرد آنزیم‌های متصل به غشا نقش دارند (Kader, 1996). این پروتئین‌ها با تشکیل لایه کوتینی در محافظت گیاه نسبت به پاتوژن‌های گیاهی و تحمل به تنش خشکی نقش مؤثر داشته و تحت تأثیر تنش‌های غیرزیستی از جمله سرما، خشکی، آسیب‌های غشایی، شوک حرارتی، نوری و ... القاء می‌شوند (Cameron *et al.*, 2006). اعمال تنش خشکی بر روی ارقام مختلف برنج افزایش بیان لیپید ترانسفرازها را نشان داده است (Hazen *et al.*, 2005). در گیاه جو تأثیر تنش خشکی بر روی لیپیدترانسفرازها، قابل القاء توسط آبسیزیک‌اسید نمی‌باشد اما این ژن به‌طور معنی‌داری در بافت‌های جوان افزایش بیان نشان داده است (Talame *et al.*, 2007). افزایش بیان

2. Peroxidase

1. Lipid transfer

کاهش میزان فتوسنتز، بیان آنزیم روبیسکو را کاهش می‌دهد. از آنجا که این کمپلکس آنزیمی دارای نیمه عمر چند روزه است، گیاهان در زمان تنش ملایم می‌توانند از پروتئین‌های سنتز شده قبلی در فتوسنتز بهره‌گیری نمایند. با افزایش میزان تنش و پایان یافتن عمر کمپلکس روبیسکو، کاهش شدید در فتوسنتز همانند نتایج بررسی حاضر مشاهده می‌شود (جدول ۳) (Ji *et al.*, 2012). نتایج بررسی مقایسه‌ای بین گیاهان گندم جو برنج و آراییدوپسیس نیز کاهش بیان ژن‌های فتوسنتزی تحت تنش خشکی را نشان داده است (Shaar-Moshe *et al.*, 2015).

با توجه به اهداف پژوهش در تعیین ژن‌های دارای بیان افتراقی و شناسایی ژن‌های کلیدی در فرایند تحمل به تنش خشکی، پیشنهاد می‌شود جداسازی و بررسی مولکولی ژن‌های مورد نظر و دست‌ورزی ژن‌های کلیدی شناسایی شده در فرایند تحمل به تنش خشکی به منظور افزایش تحمل به خشکی در گیاهان مهم زراعی در اولویت پژوهش‌های محققان قرار گیرد.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به دلیل فراهم آوردن امکانات اجرایی این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

### REFERENCES

- Ali Q, Ahsan M, Tahir M, Elahi M, farooq J and Waseem M, (2011) Gene expression and functional genomics approach for abiotic stress tolerance in different crop species. IJAVMS 5: 221-248.
- Allen DJ, Ort DR (2001) Impact of chilling temperatures on photosynthesis in warm climate plants. Trends Plant Sci. 6(1): 36-41.7.
- Amini Z, Hadad R, Moradi F (2009) The Effect of Water Deficit Stress on Antioxidant Enzymes During Generative Growth Stages in Barley (*Hordeum vulgare* L.). JWSS-Isfahan University of Technology. 12(46): 65-74.
- Asada K (1992) Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. Physiol. Plant. 85(2): 235-241.
- Bartholomew DM, Bartley GE, Scolnik PA (1991) Abscisic acid control of rbcS and cab transcription in tomato

1. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase

2. Gene encoding the small subunit of Rubisco

(*et al.*, 2009). افزایش بیان معنی‌دار پراکسیداز، تحت تنش خشکی در گیاه برنج مورد مطالعه، تاییدکننده نقش این آنزیم در حذف رادیکال‌های آزاد ایجادشده طی تنش خشکی می‌باشد (جدول ۳).

### روبیسکو<sup>۱</sup>

۵۱ بیس فسفات کربوکسیلاز (روبیسکو) در استرومای کلروپلاست قرار داشته (Spreitzer, 2003) و در کربوکسیلاسیون و اکسیژناسیون ربیولوز ۵، ۱ بیس فسفات و تثبیت دی‌اکسید کربن در اولین مرحله چرخه کالوین نقش دارد. در گیاهان تحت تنش خشکی، نقش چاپرونی هم دارد. در اثر تنش خشکی، فعالیت کربوکسیلازی آن کاهش می‌یابد و موجب کاهش عملکرد چرخه کالوین می‌شود (Allen *et al.*, 2001). محققین دیگر با بررسی بیان ژن rbcS (ژن رمز کننده زیر واحد کوچک روبیسکو)<sup>۲</sup> در گیاه برنج تحت تنش خشکی نشان دادند که تنش خشکی شدید و ملایم موجب کاهش معنی‌دار بیان این ژن می‌شود (Moumeni *et al.*, 2011; Degenkolbe *et al.*, 2009). نظیر این نتایج در گیاهان آراییدوپسیس و گوجه‌فرنگی نیز مشاهده شده است (Bartholomew *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1994). گیاه تحت تنش خشکی به منظور حفظ انرژی با بستن روزنه‌ها و

- leaves. *Plant Physiol.* 96(1): 291-296.
- Batlang U, Baisakh N, Ambavaram MM, Pereira A (2013) Phenotypic and physiological evaluation for drought and salinity stress responses in rice. *Methods Mol. Biol.* 956: 209-225
- Brkljacic JM, Samardzic JT, Timotijevic GS, Maksimovic VR (2004) Expression analysis of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) metallothionein-like gene (MT3) under different stress. *J. Plant Physiol.* 161(6): 741-746.
- Buchanan BB, Balmer Y (2005) Redox regulation: A Broadening Horizon. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 187-220.
- Cameron KD, Teece MA, Smart LB (2006) Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. *Plant Physiol.* 140(1): 176-183.
- Caverzan A, Passaia G, Rosa SB, Ribeiro CW, Lazzarotto F, Margis-Pinheiro M. (2012) Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genet. Mol. Biol.* 35(4): 1011-1019.
- Cheah B. H, Nadarajah K, Divate M. D, Wickneswari R. (2015). Identification of four functionally important microRNA families with contrasting differential expression profiles between drought-tolerant and susceptible rice leaf at vegetative stage. *BMC Genomics.* 16(1): 692.
- Cobbett C, Goldsbrough P (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 159-182.
- Degenkolbe T, Do PT, Zuther E, Repsilber D, Walther D, Hincha DK, Köhl KI (2009) Expression profiling of rice cultivars differing in their tolerance to long-term drought stress. *Plant Mol. Biol.* 69: 133-153.
- Dong Q, Kroiss L, Oakley FD, Wang BB, Brendel V (2005) Comparative EST analysis in plant systems. *Methods Enzymol.* 395: 400-416.
- Fleury D, Jefferies S, Kuchel H, Langridge P (2010) Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *J. Exp. Bot.* 4: erq152.
- Gautam N, Verma PK, Verma S, Tripathi RD, Trivedi PK, et al. (2012) Genome-wide identification of rice class I metallothionein gene: tissue expression patterns and induction in response to heavy metal stress. *Funct Integr Genomics* 12: 635-647
- Gorantla M, Babu PR, Lachagari VR, Reddy AM, Wusirika R, Bennetzen JL, Reddy AR (2007) Identification of stress-responsive genes in an indica rice (*Oryza sativa* L.) using ESTs generated from drought-stressed seedlings. *J. Exp. Bot.* 58: 253-265.
- Gorantla M, Babu PR, Lachagari VR., Feltus FA, Paterson AH, Reddy AR (2005) Functional genomics of drought stress response in rice: transcript mapping of annotated unigenes of an Indica rice (*Oryza sativa* L. cv. Nagina 22). *Curr. Sci-Bangalore.* 89(3): 496.
- Hajheidari M, Eivazi A, Buchanan BB, Wong JH, Islam M, Hosseini Salekdeh Gh (2007) Proteomics Uncovers a Role for Redox in Drought Tolerance in Wheat. *J. Proteome Res.* 6: 1451-1460.
- Hazen SP, Pathan M. S, Sanchez A, Baxter I, Dunn M, Estes B, Nguyen HT (2005). Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array. *Funct. Integr. Genomics.* 5(2): 104-116.
- Heidari P, Maleki zanjani B, Heidary Sh (2012) A study of gene expression and functional genomics of wheat, rice, cotton and festuca plants under drought stress by analyzing expressed sequence tags (EST). *Genetic Novin* 2: 129-140.
- Hosseini Salekdeh Gh, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J

- (2002) Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics* 2(9): 1131-1145.
- Ji K, Wang Y, Sun W, Lou Q, Mei H, Shen S, Chen H (2012). Drought-responsive mechanisms in rice genotypes with contrasting drought tolerance during reproductive stage. *J. Plant Physiol.* 169: 336-344
- Kader JC (1996) Lipid-transfer proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 47(1): 627-654.
- Karpinski S, Escobar C, Karpinska B, Creissen G, Mullineaux PM (1997) Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *Plant Cell.* 9: 627-640.
- Kobrehel K, Wong JH, Balogh A, Kiss F, Yee BC, Buchanan BB (1992) Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin h. *Plant Physiol.* 99: 919-924.
- Kumari S, Roy S, Singh P, Singla-Pareek S, Pareek A (2013) Cyclophilins: proteins in search of function. *Plant Signal Behav.* 8(1): e22734.
- Lozano RM, Wong JH, Yee BC, Peters A, Kobrehel K, Buchanan BB (1996) New evidence for a role for thioredoxin h in germination and seedling development. *Planta.* 200: 100-106.
- Ma DP, Tan H, Si Y, Creech RG, Jenkins JN (1995) Differential expression of a lipid transfer protein gene in cotton fiber. *Biochim. Biophys. Acta.* 1257(1): 81-84.
- Maclean JL, Hettle GP (Eds) (2002) Rice almanac: Source book for the most important economic activity on earth. IRRI (free PDF download) CABI.
- Manickavelu A, Kawaura K, Oishi K, Shin T, Kohara Y, Yahiaou N ... & Yano K (2012) Comprehensive functional analyses of expressed sequence tags in common wheat (*Triticum aestivum*). *DNA Res.* 19(2): 165-177.
- Marx C, Wong JH, Buchanan BB (2003) Thioredoxin and germinating barley: targets and protein redox changes. *Planta.* 216: 454-460.
- Masoudi-Nejad A, Tonomura K, Kawashima S, Moriya Y, Suzuki M, Itoh M, Kanehisa M, Endo T, Goto S (2006) EGassembler: online bioinformatics service for large-scale processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. *Nucleic Acids Res.* 34: 459-462.
- Mohammadi PP, Moieni A, Komatsu S (2012) Comparative proteome analysis of drought-sensitive and drought-tolerant rapeseed roots and their hybrid F1 line under drought stress. *Amino Acids.* 43(5): 2137-2152.
- Nagaraj SH, Gasser R.B, Ranganathan S (2007) A hitchhiker's guide to expressed sequence tag (EST) analysis. *Brief. Bioinform.* 8: 6-21.
- Navabpour S, Morris K, Allen R, Harrison E, Mackerness S, Buchanan-Wollaston V (2003) Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 54: 2285-2292.
- Ogata O, Suzukim H (2011) Plant expressed sequence tags databases: practical uses and the improvement of their searches using network module analysis. *Plant Biotech.* 28: 351-360.
- Orosz F, Olah J, Ovadi J (2006) Triosephosphate isomerase deficiency: facts and doubts. *IUBMB Life.* 58(12): 703-715.
- Ramamoorthy R, Jiang SY, Kumar N, Venkatesh PN, Ramachandran S (2008) A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments. *Plant Cell Physiol.* 49: 865-879.
- Rosa SB, Caverzan A, Teixeira FK, Lazzarotto F, Silveira JA, Ferreira-Silva SL, ... & Margis-Pinheiro M (2010). Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox

- responses in rice. *Phytochemistry*. 71(5): 548-558.
- Serrato AJ, Cejudo FJ (2003) Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta*. 217(3): 392-399.
- Shaar-Moshe L, Hübner S, Peleg Z. (2015). Identification of conserved drought-adaptive genes using a cross-species meta-analysis approach. *BMC Plant Biol*. 15(1): 1.
- Spreitzer RJ (2003) Role of the small subunit in ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 414(2): 141-149.
- Stewart GA (2000) The molecular biology of allergens (Chapter 72). In: Busse W.W, Holgate S.T (ed) *Asthma and Rhinitis*, Blackwell Science Ltd USA, 1113-1114.
- Szira F, Börner A, Neumann K, Nezhad K. Z, Galiba G, Bálint AF (2011) Could EST-based markers be used for the marker-assisted selection of drought tolerant barley (*Hordeum vulgare*) lines?. *Euphytica*. 178(3): 373-391.
- Talame V, Ozturk NZ, Bohnert HJ, Tuberosa R. (2007) Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *J. Exp. Bot.* 58(2): 229-240.
- Williams J, Bulman MP, Neill SJ (1994) Wilt induced ABA biosynthesis, gene expression and down regulation of rbcS mRNA levels in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 91(2): 177-182.
- Xoconostle-Cazares B, Ramirez-Ortega FA, Flores-Elenes L, Ruiz-Medrano R (2010) Drought tolerance in crop plants. *Am. J. Plant Physiol.* 5(5): 1-16.
- Xu Y, Harris-Haller LW, McCollum JC, Hardin SH, Hall TC (1993) Nuclear gene encoding cytosolic triosephosphate isomerase from rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant physiol.* 102(2): 697.
- Yang Z, Wu Y, Li Y, Ling HQ, Chu C (2009) OsMT1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. *Plant Mol. Biol.* 70(1-2): 19-229.
- Zhang J, Kirkham MB (1994) Drought-Stress-Induced Changes in Activities of Superoxide Dismutase, Catalase, and Peroxidase in Wheat Species. *Plant Cell Physiol.* 35(5): 785-791.
- Zhou GK, Xu YF, Liu JY (2005) Characterization of a rice class II metallothionein gene: tissue expression patterns and induction in response to abiotic factors. *J. Plant Physiol.* 162: 686-696.
- Zhou J, Wang X, Jiao Y, Qin Y, Liu X, He K, ... & Deng XW (2007) Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot, flag leaf, and panicle. *Plant Mol. Biol.* 63(5): 591-608.