

پیش‌بینی محاسباتی ژن‌های پاسخ‌دهنده به سرما در کلزا از طریق مقایسه ژنومی با گیاه *Arabidopsis thaliana* مدل

خزر ادریسی مریان^۱، حبیب‌الله سمیع‌زاده لاهیجی^{۲*}، سیدحسن حسینی^۳، ناصر فرخی^۴

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، ایران

۲. استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، ایران

۳. استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، ایران

۴. استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۱۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۱/۴)

In silico prediction of cold responsive genes in canola by comparative genomics using *Arabidopsis thaliana*

Khazar Edrisi Maryan¹, Habibollah Samizadeh Lahiji^{2*}, Hassan Hasani Komeleh³, Naser Farrokhi⁴

1. Ph.D. Candidate of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

(Received: Jul. 1, 2018 - Accepted: Jan. 24, 2019)

Abstract

Low temperature is an important abiotic stress limiting the production and geographical dispersion of many crops, including rapeseed, as an important oil crop. In this study, known *cis*-elements regulating molecular responses of plant to cold stress were used to identify genes involved in cold tolerance. From 62,384 Unigenes from Brassica Genome Gateway, 56 cold responsive genes were identified. Promoter analysis, gene ontology enrichment, co-occurrence, protein-protein interaction and *in silico* gene expression analysis were performed to validate the results of gene identification. The results showed known *cis*-element appearance in promoter region of all identified genes which involved in different biological pathways such as Calvin cycle, respiration and signal transduction in different cell parts. Co-occurrence study of identified genes illustrated mutual connections of genes with correlations above 0.64. Promoter analysis, PPI network and investigating transcription factors involved in transcription regulation of 56 identified genes and 98 co-expressed genes indicated the molecular mechanisms and similar pathways of plant response to cold and introduce candidate genes to be used in breeding and genetic engineering programs.

Keywords: Co-expressed regulatory network, Gene Ontology, Promoter analysis, Protein-protein interaction, Transcription factors.

چکیده

سرما تنش مهمی است که تولید و پراکندگی جغرافیایی بسیاری از گیاهان زراعی از جمله کلزا به عنوان یک گیاه روغنی مهم را محدود می‌کند. در این مقاله عناصر سیس شناخته شده که تنظیم‌کننده پاسخ مولکولی گیاه به تنش سرما هستند، برای شناسایی ژن‌های دخیل در تحمل سرما استفاده شدند. از تعداد ۶۲۳۸۴ یونیزن از پایگاه داده Brassica Genome Gateway، ۵۶ عدد ژن مسئول سرما شناسایی شدند. برای اعتبارسنجی ژن‌های شناسایی شده آنالیز پروموتور، هستی‌شناسی، هم‌بیانی، برهمکنش پروتئین-پروتئین و آنالیز بیان ژن به صورت پیش‌بینی محاسباتی انجام شد. نتایج حاکی از حضور عناصر سیس معمول پاسخ به سرما در ناحیه پروموتور تمامی ژن‌های شناسایی شده بود که در مسیرهای مختلف زیستی مانند چرخه کالوین، تنفس سلولی و مسیرهای انتقال پیام در بخش‌های مختلف سلول قرار داشتند. بررسی هم‌بیانی ژن‌های شناسایی شده، اثر متقابل ژن‌ها را با همبستگی بالای ۰/۶۴ نشان داد. بررسی پروموتور، شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین و بررسی فاکتورهای رونویسی دخیل در تنظیم رونویسی ۵۶ عدد ژن شناسایی شده و ۹۸ عدد ژن هم‌بیان آن‌ها حاکی از سازوکار مولکولی و مسیرهای مشابه و مشترک پاسخ به تنش سرما در گیاه است و ژن‌های کاندید جهت بهره‌برداری در برنامه‌های اصلاحی و مهندسی ژنتیک کلزا را معرفی می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آنالیز پروموتور، برهمکنش پروتئین-پروتئین، شبکه تنظیمی ژن‌های هم‌بیان، فاکتورهای رونویسی، هستی‌شناسی.

مقدمه

تنش‌های غیرزیستی چالشی بزرگ در تأمین محصولات غذایی هستند و عملکرد گیاهان زراعی را تا ۷۰ درصد کاهش می‌دهند (Agarwal *et al.*, 2006). تنش‌ها فشار زیادی بر تولیدات کشاورزی در جهان به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه وارد می‌کنند که رشد و بارآوری محصولات زراعی به‌طور قابل توجهی توسط چنین محرک‌هایی کاهش می‌یابد (Hossain *et al.*, 2010). در میان تنش‌های غیرزیستی، دمای پایین (سرمزدگی و یخ زدگی) تولید بسیاری از گیاهان زراعی مهم مانند برنج و ذرت را محدود می‌کند (Andaya & Mackill, 2003) و همچنین کلزا به عنوان گیاه روغنی مهم، اغلب تحت تنش‌های غیرزیستی از جمله دمای پایین قرار می‌گیرد که پیامد آن تأخیر در رشد گیاه و حتی مرگ می‌تواند باشد (Liang *et al.*, 2011). مکانیسم مولکولی مقاومت و سازگاری به سرما بسیار حائز اهمیت است و بدین لحاظ شناسایی ژن‌های جدید و الگوی بیان آن‌ها در پاسخ به تنش‌های مختلف، اطلاعات خوبی برای کشف عملکرد ژن‌ها در گیاهان سازگار به تنش‌های مختلف و تکمیل استراتژی‌ها برای بهبود تحمل تنش در تقویت گیاهان در اختیار می‌گذارد (Bohnert & Cushman, 2002). غربال ژن‌های دخیل در تحمل به سرما استراتژی شایان توجهی در تقویت گیاهان زراعی با استفاده از مهندسی ژنتیک است (Dai *et al.*, 2004).

ژن‌ها و فرآورده‌های ژنی زیادی جهت تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی در سطح رونویسی و ترجمه پاسخ می‌دهند. کشف این ژن‌های جدید هدف اصلی تمامی اصلاحگرهای گیاهی است (Ali *et al.*, 2011). در تنش سرمایی، تظاهر بسیاری از ژن‌ها نه تنها در تقویت سازگاری تحمل سرمایی چون بیوستنز اسمولیت‌ها (Taji *et al.*, 2002)، تولید آنتی‌اکسیدان‌ها (Prasad *et al.*, 1994)،

افزایش سیالیت غشا (Orvar *et al.*, 2000) عمل می‌کنند، بلکه در کنترل تظاهر ژنی و انتقال پیام در پاسخ به تنش، مانند فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌های دخیل در ویرایش RNA و خروج از هسته (Chinnusamy *et al.*, 2007) نیز نقش دارد (Yu *et al.*, 2010) و در این بین، پروموتور نقش مهمی را در تنظیم بیان ژن ایفا می‌کند. عناصر تنظیمی بسیاری مانند TATA box، GC box، CAAT box دارای مکان اتصال فاکتورهای رونویسی، تقویت‌کننده‌ها (Enhancers) و بازدارنده‌های (Repressors) مورد نیاز بیان ژن‌ها در زمان مناسب هستند (Wittkopp & Kalay, 2012). عناصر تنظیمی سیس، واحدهای تنظیمی رونویسی ژن‌ها هستند که پاسخ به تنش‌های مختلف را کنترل می‌کنند. پیشرفت‌های اخیر در تکنیک‌هایی مانند ریزآرایه، RNA-seq و RNA interference و منجر به شناسایی و معرفی نواحی پروموتوری ژن‌های هدف شده‌اند. اما این تکنیک‌ها هزینه‌بر هستند و از نظر تکنیکی چالش‌انگیز می‌باشند. بنابراین از روش‌های محاسباتی (*in silico*) بررسی نواحی پروموتوری جهت شناسایی عناصر سیس مسئول در تنظیم ژن‌ها استفاده می‌شود (Kaur & Pati, 2016). از برنامه‌های محاسباتی مختلفی هم برای جستجوی عناصر سیس شناخته شده و مطالعه و سازماندهی آن‌ها می‌توان استفاده کرد. ابزارهای مبتنی بر وب مانند PLACE (Higo *et al.*, 1999)، PlantCARE (Lescot *et al.*, 2002)، AGRIS (Davuluri *et al.*, 2003) و TRANSFACT (Davuluri *et al.*, 2003) برای آنالیز عناصر تنظیمی سیس در ژن‌های گیاهی توسعه داده شده‌اند. از این‌رو در این مقاله برای شناسایی و دسته‌بندی ژن‌های دخیل در سرما از ابزارهای مبتنی بر وب استفاده شده و نتایج به‌دست آمده با استفاده از منابع موجود اعتبارسنجی شده‌اند.

به‌عنوان ژن‌های پاسخ به تنش سرما (GO-ID: 9409; p-value:5.2035E-101) شناسایی شدند که دارای حداقل یکی از عناصر تنظیمی سیس^۱ مرتبط با تنش سرما در پروموتور خود بودند (جدول ۲). بررسی ژن‌های مسئول سرما در کلزا با استفاده از عناصر سیس مرتبط در ناحیه پروموتوری انجام شد. عناصر سیس مرتبط با تنش‌های زیستی و غیرزیستی، هورمون‌های گیاهی و عناصر مرتبط با نمو در پروموتور ژن‌های مسئول سرما با فراوانی‌های مختلف ردیابی شد. عناصر سیس رایج مرتبط با تنش سرما شامل ABRE (ABA-responsive elements)، DRE (dehydration-responsive elements)، HSE (heat shock-responsive elements) و LTR (low temperature responsive elements) بودند. عناصر سیس هورمونی شامل اکسین، جیبرلین، سالیسیلیک اسید، اتیلن و متیل جاسمونات بودند. CAAT-box، TATA-box، Unnamed_4، G-box، ARE، TCA-element، Skn-1_motif، circadian دارای بالاترین فراوانی در ناحیه پروموتوری بودند. نوع و فراوانی عناصر سیس در ژن‌های مسئول سرما در شکل ضمیمه ۱ ارائه شده است. فاکتورهای رونویسی بر اساس نواحی سیس در پروموتور ژن‌های مسئول سرما از پایگاه داده PlantPAN2.0 گردآوری شدند و نتایج نشان داد که فاکتورهای رونویسی مهم دخیل در رونویسی ژن‌های پاسخ به سرما از خانواده‌های bZIP، bHLH، WRKY، AP2، GATA، Dof، NF-Y و Myb بودند (جدول ۱). بررسی عملکرد و مکان سلولی ژن‌های شناسایی‌شده با نرم‌افزار Cytoscape نشان داد که محصولات ژن‌های شناسایی‌شده در بخش‌های مختلف سلول از جمله سیتوپلاسم، هسته، کلروپلاست، میتوکندری و

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی ژن‌های پاسخ‌دهنده به سرما، یونیژن‌های آرآبیدوپسیس تالیانا از پایگاه داده <http://brassica.nbi.ac.uk> (از پایگاه داده "NCBI/ Unigene" نیز قابل دسترسی هستند) (Shengyi *et al.*, 2018). از ۶۲۳۸۴ یونیژن، تعداد ۲۰۲ یونیژن با برچسب "پاسخ به سرما" انتخاب شدند. توالی‌های پروموتوری (۱Kb) پیش از مکان آغاز رونویسی) از پایگاه داده PlantPromoter Database (Hieno *et al.*, 2014) دانلود شدند و با استفاده از PlantCare (Lescot *et al.*, 2002) عناصر سیس مرتبط با سرما در ناحیه پروموتوری مورد بررسی قرار گرفتند. آنالیز هستی‌شناسی ژن‌های مسئول سرما برای تعیین فرایند زیستی، عملکرد مولکولی و جایگاه فعالیت ژن‌ها با استفاده از The Biological Network Gene Ontology tool (BINGO) (Shannon *et al.*, 2003) نرم‌افزار Cytoscape انجام شد. برای بررسی مسیرهای زیستی از پایگاه داده KEGG (Kanehisa *et al.*, 2017) استفاده شد. فاکتورهای رونویسی مرتبط با ژن‌های مسئول سرما بر اساس توالی پروموتوری از PlantPAN2.0 (Chow *et al.*, 2015) به‌دست آمدند. برای بررسی برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین (PPI) ابتدا ژن‌های هم‌بیان از ATTEDII (Obayashi *et al.*, 2018) (STRING نسخه 10.1 (Szkarczyk *et al.*, 2017) شبکه PPI رسم شد. از Genevestigator (Hruz *et al.*, 2008) برای بررسی پروفایل بیان ژن‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

آنالیز پروموتور

از میان ۲۰۲ یونیژن با برچسب "پاسخ به سرما" که مورد آنالیز هستی‌شناسی قرار گرفتند تعداد ۵۶ عدد

¹ cis-elements

(شکل ضمیمه ۱).

فاکتورهای رونویسی دخیل در بیان ژن‌های شناسایی شده از خانواده فاکتورهای رونویسی مهم در تنش سرما شامل bZIP (Chinusamy et al., 2003)، bHLH (Wang et al., 2003)، WRKY (Ujjal et al., 2016)، AP2 (Du et al., 2016)، GATA (Yuan et al., 2016)، NF-Y (Jing et al., 2015)، Myb (Roy, 2016) بودند که عناصر سیس مرتبط با آن‌ها در ناحیه پرموتری ژن‌ها وجود داشت.

آنالیز ژنی به صورت پیش‌بینی محاسباتی

به منظور بررسی بیان ۵۶ ژن شناسایی شده از Genevestigator استفاده شد. همچنین به منظور تأیید نتایج، شبکه هم‌بیانی رسم شد و برهمکنش پروتئین-پروتئین بررسی شد (شکل ۱). نتایج می‌تواند تاییدی بر وجود و صحت شناسایی ژن‌های پاسخ دهنده به سرما با استفاده از نرم افزارها و روش‌های بیوانفورماتیکی می‌باشد. ژن‌های پاسخ‌دهنده به سرما شناسایی شده علاوه بر آنالیز هستی‌شناسی، با استفاده از نرم‌افزار Genevestigator هم بررسی شدند. از آنجا که هم‌بیانی و ارتباط متقابل ژن‌ها می‌تواند نشانگر قابل اعتمادی از مشارکت آن‌ها در پاسخ به شرایط خاص باشد، هم‌بیانی ژن‌های شناسایی شده نیز به منظور تایید پیش‌بینی‌های محاسباتی انجام شد. تمامی ژن‌های شناسایی شده مسئول سرما همبستگی بالای ۰/۶۴ و ارتباط متقابل حداقل ۰/۵ داشتند (شکل ۱). نتایج آنالیز هم‌بیانی با استفاده از آنالیز شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین با استفاده از STRING نسخه 10.1 تایید شد. اکثر پروتئین‌های کد شده با ژن‌های شناسایی شده با یکدیگر اثر متقابل داشتند (شکل ۱).

غشاهای سلولی پراکنده بودند (جدول ۲). این ژن‌ها در فعالیت‌های مختلفی از جمله اتصال به DNA، اتصال به یون، فعالیت فسفوریبونوکلئازی و فعالیت کینازی نقش داشتند (جدول ۲). شناسایی عناصر سیس در ناحیه پرموتری ژن‌ها احتمال هم‌بیانی ژن‌ها را در شبکه ژنی مشخص می‌کند. درصد بالای شباهت عناصر سیس در ژن‌های شناسایی شده و هم‌بیانی آن‌ها می‌تواند نشان‌دهنده مسیرهای کنترلی و تنظیمی بیان مجموعه‌ای از ژن‌ها در پاسخ به انتقال پیام در تنش باشد.

علاوه بر عناصر سیس معروف مرتبط با سرما مانند DRE, ABRE, LTR, HSP (Jiang et al., 1996; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2005). عناصر مرتبط با هورمون‌های گیاهی نیز در پرموتری ژن‌های مسئول سرما رویت شد. هورمون‌های گیاهی جنبه‌های مختلف رشد و نمو را متأثر می‌کنند (Peleg & Blumwald, 2011) و جهت سازگاری با تنش‌های غیرزیستی نیز ضروری هستند (Santner & Estelle, 2009; Wang et al., 2009; Messing et al., 2010) و سریعاً بیان ژن را با القا و یا جلوگیری از تجزیه تنظیم‌کننده‌های رونویسی تغییر می‌دهند (Santner & Estelle, 2009). هموستازی تغییرات هورمونی در پاسخ به سرما منجر به پاسخ سریع، سازگاری و تحمل به تنش می‌شود. گزارش‌های زیادی مبنی بر تنظیم بیان ژن‌ها در پاسخ به سرما توسط هورمون‌های گیاهی وجود دارد. وجود عناصر سیس مسئول سرما در ناحیه پرموتری ژن‌های شناسایی شده تأییدکننده نتایج حاصل از پیش‌بینی محاسباتی^۲ بوده و همچنین حضور عناصر سیس مشابه در ۹۸ ژن هم‌بیان در شبکه ژنی نیز تأییدی بر مسیر کنترلی یکسان در پاسخ به سرما است

1. Coexpression

2. *in silico*

داشتند که عملکرد مولکولی آن‌ها شامل فعالیت آنتی‌اکسیدانی، اتصال به ماکرو و میکرومولکول‌ها، فعالیت کاتالیکی، انتقال پیام، نقش در ساختار، تنظیم ترجمه و فعالیت‌های انتقالی است (جدول ۲). پروتئین‌ها در ۴ مسیر زیستی شامل متابولیسم کربن نیتروژن (KEGG Pathway ID:01200)، متابولیسم فسفوریلاسیون اکسیداتیو (KEGG Pathway ID:00190)، و مسیرهای متابولیکی (KEGG Pathway ID:01100) قرار دارند. همچنین آنزیم‌های کینازی فعال در مسیر انتقال پیام شامل MEK1، MEK2 و S6K2 می‌باشند.

تعداد ۵ ژن کدکننده پروتئین‌های میتوکندریایی شامل LOS2، MDAR5، FRO، RBG2 و SHM1 و ۱۲ ژن کدکننده پروتئین‌های کلروپلاستی شامل PRK، SEX1، CA، COR314-TM2، LOS1، COR15A، GRP7، CPHSC70-1، RBCS1A، COR413IM1، CFBP1 و OEP161 از ژن‌های مسئول سرما شناسایی شدند (جدول ۲).

شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین

به‌منظور بررسی مسیرهای تنظیمی و کنترلی ژن‌های دخیل در سرما، ژن‌های هم‌بیان از پایگاه داده ATTEDII گردآوری شدند و تعداد ۹۸ ژن نهایی از ۲۴۰۷ ژن هم‌بیان بعد از آنالیز هستی‌شناسی با نرم‌افزار Cytoscape (شکل ۲) که پاسخگو به سرما ($P\text{-value}=5.8682E-57$) بودند برای رسم شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین در STRING 10.1 مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۳). آنالیز پروموتور ژن‌های هم‌بیان، حضور عناصر سیس دخیل در سرما را نشان داد (شکل ۱) و آنالیز هستی‌شناسی برای ژن‌های هم‌بیان نیز حاکی از پراکندگی پروتئین‌های گذشته در سیتوپلاسم، هسته، کلروپلاست، میتوکندی و نقش در فعالیت‌های کاتالیکی، انتقالی، ساختاری، آنتی‌اکسیدانی و غیره داشت (شکل ۲).

تعداد ۵۶ ژن دخیل در سرما در کلزا در دسته پروتئین‌های اسکلت سلولی، آنزیم‌های هیدرولازی و لیازی، پروتئین‌های اتصال به نوکلئیک اسید، فاکتورهای رونویسی، ترانسفرازها و ترانسپورترها قرار

جدول ۱. فاکتورهای رونویسی دخیل در بیان ژن‌های شناسایی‌شده از پایگاه داده PlantPAN 2.0 بر اساس عناصر سیس در

ناحیه پروموتوری هر ژن

TFBS ID	Family of TFBS	Sequence	Support
TF_motif_seq_0410	bHLH	CACGCg	98.2
TF_motif_seq_0270	WRKY	AGTCA	98.2
TF_motif_seq_0255	AP2; RAV; B3	TGTTG	100.0
TF_motif_seq_0508	SBP	ttGTATGca	100.0
TF_motif_seq_0237	GATA; tify	aaTGATCtc	100.0
TF_motif_seq_0239	Dof	tCGTTAct	100.0
TF_motif_seq_0241	ZF-HD	TTAAT	100.0
TF_motif_seq_0243	GATA; tify	GATAT	100.0
TF_motif_seq_0257	NF-YB; NF-YA; NF-YC	ATTGC	100.0
TF_motif_seq_0267	Trihelix	CTTAC	100.0
TF_motif_seq_0271	bZIP	taaATAATta	100.0
TF_motif_seq_0254	AP2; ERF	cgaCCGACat	100.0
TF_motif_seq_0252	Myb/SANT; MYB; ARR-B	ctCTGAG	100.0
TF_motif_seq_0246	Homeodomain; TALE	tcAATCAttc	100.0

جدول ۲. ژن‌های مسئول سرما با حداقل یکی از عناصر سیس معمول در پاسخ به سرما

No.	Gene name	Unigene	Protein description	Cell Component*	Molecular Function*	Reference
1	ERD7	AT2G17840	Protein EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 7, chloroplastic	Chloroplastic	Circadian rhythm, response to abscisic acid, response to cold	Kimura <i>et al.</i> , 2003
2	MKK2	AT4G29810	Mitogen-activated protein kinase 2	Membrane, Cytoplasm, Plasma membrane	ATP binding, MAP kinase activity	Furuya <i>et al.</i> , 2013
3	ICE1	AT3G26744	Transcription factor ICE1	Nucleuse	Transcription factor activity	Chinnusamy <i>et al.</i> , 2003, Miura <i>et al.</i> , 2003
4	AT3G09200	AT3G09200	60S acidic ribosomal protein P0-2	Organelle, Cytoplasm	Copper ion binding, structural constituent of ribosome	Bae <i>et al.</i> , 2003
5	PRK	AT1G32060	Phosphoribulo kinase	Chloroplast	Kinase activity	Goulas <i>et al.</i> , 2006
6	AT5G66400	AT5G66400	Dehydrin Rab18	Cytoplasm	Copper ion binding, nickel cation binding	Puhakainen <i>et al.</i> , 2004
7	VRN2	AT4G16845	Polycomb group protein VERNALIZATION 2	Nucleuse, Organelle	Chromatin DNA binding, metal ion binding	Wood <i>et al.</i> , 2006
8	COR413-PM1	AT2G15970	Cold-regulated 413 plasma membrane protein 1	Organelle, Plasma membrane	Cellular response to cold acclimation, response to abscisic acid	Breton <i>et al.</i> , 2003
9	SEX1	AT1G10760	Alpha-glucan water dikinase 1, chloroplastic	Chloroplast, Mitochondrion	Water dikinase activity	Yano <i>et al.</i> , 2005
10	HOS10	AT1G35515	Transcription factor MYB8	Nucleuse	RNA polymerase II transcription factor activity	Zhu <i>et al.</i> , 2010
11	SFR6	AT4G04920	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 16	Nucleuse	A coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes	Knight <i>et al.</i> , 2009
12	CA1	AT3G01500	Beta carbonic anhydrase 1, chloroplastic	Apoplstdt, Chloroplast	Carbonate dehydratase activity	Goulas <i>et al.</i> , 2006
13	TUB6	AT5G12250	Tubulin beta-6 chain	Cytoplasm, Mitochondrion	GTPase activity	Chu <i>et al.</i> , 1993
14	AT4G34150	AT4G34150	AT4G34150	Cytoplasm, Plastid	Response to cold	Kawamura and Uemura. 2003
15	EMB2770	AT4G03430	Protein STABILIZED1	Cajal body	Pre-mRNA splicing factor required for splicing and for the turnover of unstable transcripts	Lee <i>et al.</i> , 2006
16	CBF2	AT4G25470	Dehydration-responsive element-binding protein 1C	Nuclear	Sequence-specific DNA binding, transcription factor activity	Vergnolle <i>et al.</i> , 2005,
17	ESK1	AT3G55990	Protein ESKIMO 1	Golgi	O-acetyltransferase activity	Xin and Browse. 1998
18	AT2G37190	AT2G37190	60S ribosomal protein L12-1(RPL12A)	Chloroplast, Cytoplasm	rRNA binding, structural constituent of ribosome	Bae <i>et al.</i> , 2003
19	LTI65	AT5G52300	Low-temperature-induced 65 kDa protein		Abscisic acid-activated signaling pathway, response to cold,	Nordin <i>et al.</i> , 1993
20	COR314-TM2	AT1G29390	Cold-regulated 413 inner membrane protein 2, Chloroplastic	Chloroplast	Cellular response to cold, cold acclimation	Okawa <i>et al.</i> , 2008
21	AT4G30650	AT4G30650	UPF0057 membrane protein At4g30650	Mitochondrion	Defense response to fungus	Okawa <i>et al.</i> , 2008
22	CBL1	AT4G17615	Calcineurin B-like protein 1	Mitochondrion	Calcium ion binding, kinase binding	Cheong <i>et al.</i> , 2003
23	LOS2	AT2G36530	Bifunctional enolase 2/transcriptional activator	Apoplast, Chloroplast Mitochondrion	Copper ion binding, DNA binding, magnesium ion binding, phosphopyruvate hydratase activity	Lee <i>et al.</i> , 2002
24	LOS1	AT1G56070	Elongation factor 2	Apoplast, Chloroplast, Cytoplasm	Copper ion binding, GTPase activity	Ishitani <i>et al.</i> , 1997

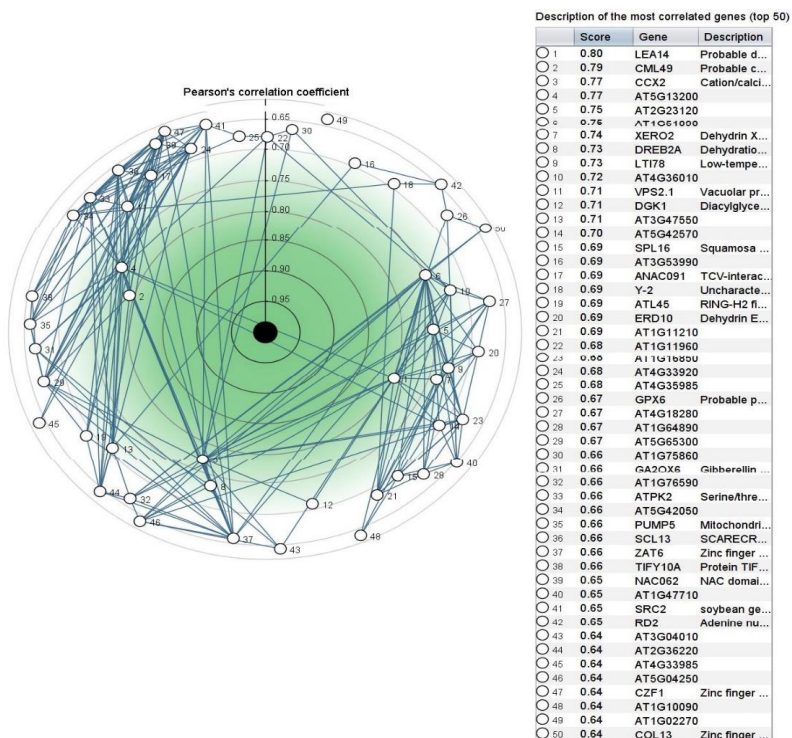
ادامه جدول ۲. ژن‌های مسئول سرما با حداقل یکی از عناصر سیس معمول در پاسخ به سرما

No.	Gene name	Unigene	Protein description	Cell Component*	Molecular Function*	Reference
25	KIN1	AT5G15960	Stress-induced protein KIN1	Cytoplasm	Cold acclimation	Vergnolle <i>et al.</i> , 2005, Kurkela <i>et al.</i> , 1990
26	GI	AT1G22770	Protein GIGANTEA	Cytoplasm, Nucleuse	Involved in regulation of circadian rhythm and photoperiodic flowering.	Cao <i>et al.</i> , 2005
27	COR15A	AT2G42540	Protein COLD-REGULATED 15A, chloroplastic	Chloroplast	Galactose binding, lipid binding	Dong <i>et al.</i> , 2011
28	HOS1	AT2G39810	E3 ubiquitin-protein ligase HOS1	Nucleuse, Cytoplasm	Metal ion binding, ubiquitin-protein transferase activity	Lee <i>et al.</i> , 2012
29	ERD10	AT1G20450	Dehydrin ERD10	Cytoplasm, Nucleuse	Actin binding, copper ion binding, nickel cation binding	Reyes <i>et al.</i> , 2008
30	MEKK1	AT4G08500	Mitogen-activated protein kinase 1	Endo, Nucleuse, Plasma membrane	MAP kinase activity, protein serine/threonine kinase activity	Furuya <i>et al.</i> , 2013
31	STRS2(RH25)	AT5G08620	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 25	Nucleuse, Cytoplasm	ATP-dependent RNA helicase activity, RNA binding	Kim <i>et al.</i> , 2008
32	GRP2	AT4G38680	Cold shock protein 2	Cytoplasm, Nucleuse	Double-stranded DNA binding	Karlson and Imai, 2003, Kim <i>et al.</i> , 2007
33	S6K2	AT3G08720	Serine/threonine-protein kinase AtPK2/AtPK19	Nucleuse, Cytoplasm	ATP binding, kinase activity, protein kinase activity, protein serine/threonine kinase activity	Mizoguchi <i>et al.</i> , 1995, Mizoguchi <i>et al.</i> , 1996
34	GRP7	AT2G21660	Glycine-rich RNA-binding protein 7	Apoplast, Chloroplast, Cytoplasm	Double-stranded DNA binding, mRNA binding, RNA binding, single-stranded DNA binding	Kwak <i>et al.</i> , 2005
35	AT4G30660	AT4G30660	UPF0057 membrane protein At4g30660	Membrane	Low temperature and salt responsive protein family	
36	CPHSC70-1	AT4G24280	Heat shock 70 kDa protein 6, chloroplastic	Chloroplast, Mitochonderian	ATP binding, unfolded protein binding	Bae <i>et al.</i> , 2003
37	COR47	AT1G20440	Dehydrin COR47	Cytoplasm, Mitochonderian	copper ion binding, nickel cation binding	Vergnolle <i>et al.</i> , 2005, Ishitani <i>et al.</i> , 1998
38	CZF1	AT2G40140	Zinc finger CCCH domain-containing protein 29	Nucleuse	DNA binding, metal ion binding, transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	Vergnolle <i>et al.</i> , 2005
39	TCH2	AT5G37770	Calcium-binding protein CML24	Plasma membrane	calcium ion binding	Delk <i>et al.</i> , 2005
40	RBCS1A	AT1G67090	Ribulose biphosphate carboxylase small chain 1A, chloroplastic	Apoplast, Chloroplast	copper ion binding, monooxygenase activity, ribulose-biphosphate carboxylase activity	Kawamura and Uemura. 2003
41	RZ1A	AT3G26420	Glycine-rich RNA-binding protein RZ1A	Nucleuse	Binds RNA and DNA sequences with a preference to single-stranded nucleic acids. Displays strong affinity to poly(G) and poly(U) sequences. May be involved in tolerance to cold stress.	Kim <i>et al.</i> , 2005
42	PER3	AT1G05260	Peroxidase 3	Secreted	Removal of H ₂ O ₂ , oxidation of toxic reductants, biosynthesis and degradation of lignin, suberization, auxin catabolism, response to environmental stresses such as wounding, pathogen attack and oxidative stress.	Liorente <i>et al.</i> , 2002

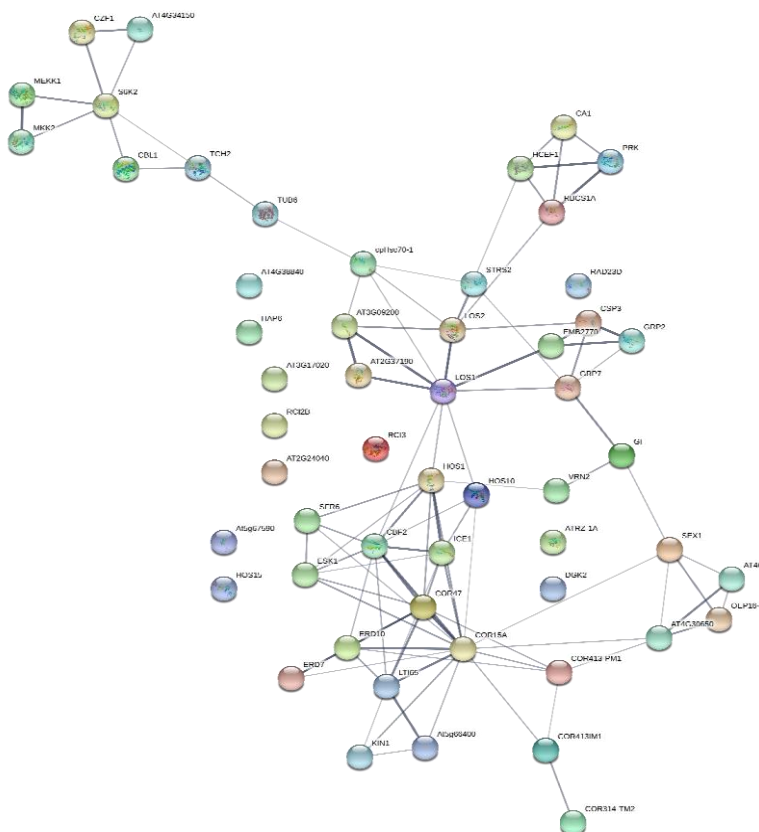
ادامه جدول ۲. ژن‌های مسئول سرما با حداقل یکی از عناصر سیس معمول در پاسخ به سرما

No.	Gene name	Unigene	Protein description	Cell Component*	Molecular Function*	Reference
43	COR413IM1	AT1G29395	Cold-regulated 413 inner membrane protein 1, chloroplastic	Chloroplast, inner membrane	-	Okawa <i>et al.</i> , 2008
44	CFBP1	AT3G54050	Fructose-1,6-bisphosphatase 1, chloroplastic	Chloroplast	Catalyzes the irreversible reaction from fructose-1,6-bisphosphate to fructose-6-phosphate and inorganic phosphate, to regenerate the primary CO ₂ acceptor molecule, ribulose-1,5-bisphosphate (Probable).	Goulas <i>et al.</i> , 2006
45	FRO1	AT5G67590	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial	Mitochondrion	Accessory subunit of the mitochondrial membrane respiratory chain NADH dehydrogenase (Complex I), that is believed not to be involved in catalysis.	Lee <i>et al.</i> , 2002
46	At3g17020	AT3G17020	AT3g17020/K14A17_14	Plasma Membrane	Hydrolase activity	Kawamura and Uemura, 2003
47	OEP161	AT2G28900	Outer envelope pore protein 16-1, chloroplastic	Chloroplast	Voltage-dependent high-conductance channel with a slight cation-selectivity; selective for amino acids but excludes triosephosphates or uncharged sugars (By similarity).	Drea <i>et al.</i> , 2006
48	RPN2	AT4G21150	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 2	Endoplasmic reticulum	Essential subunit of the N-oligosaccharyl transferase (OST) complex which catalyzes the transfer of a high mannose oligosaccharide from a lipid-linked oligosaccharide donor to an asparagine residue within an Asn-X-Ser/Thr consensus motif in nascent polypeptide chains.	Kawamura and Uemura, 2003
49	RCI2B	AT3G05890	Hydrophobic protein RCI2B	Membrane		Capel <i>et al.</i> , 1997
50	DGK2	AT5G63770	Diacylglycerol kinase 2	Membrane protein	Phosphorylates the second messenger diacylglycerol (DAG) to generate phosphatidic acid (PA), another important signaling molecule. PA is required for plant development and responses to abiotic stress and pathogen attack.	Gomez-Merino <i>et al.</i> , 2004
51	CSP3	AT2G17870	Cold shock domain-containing protein 3	Nucleus	Chaperone that binds to RNA, single- (ssDNA) and double-stranded (dsDNA) DNA, and unwinds nucleic acid duplex. Promotes freezing tolerance.	Kim <i>et al.</i> , 2009
52	At2g24040	AT2G24040	UPF0057 membrane protein At2g24040	Membrane		
53	HOS15	AT5G67320	WD40 repeat-containing protein HOS15	Nucleus	Acts as repressor of cold stress-regulated gene expression. Interacts specifically with and promotes deacetylation of histone H4. Plays a role in gene regulation for plant acclimation and tolerance to cold stress.	Zhu <i>et al.</i> , 2008
54	SAUR14	AT4G38840	At4g38840	Plasma Membrane	Response to cold	Lee <i>et al.</i> , 2005
55	RAD23D	AT5G38470	Ubiquitin receptor RAD23d	Nucleus	May be involved in nucleotide excision repair.	Kawamura and Uemura, 2003
56	LTI65	AT5G52300	Low-temperature-induced 65 kDa protein	-	-	Nordin <i>et al.</i> , 1993

موارد ستاره‌دار با استفاده از Cytoscape آنالیز شده‌اند.

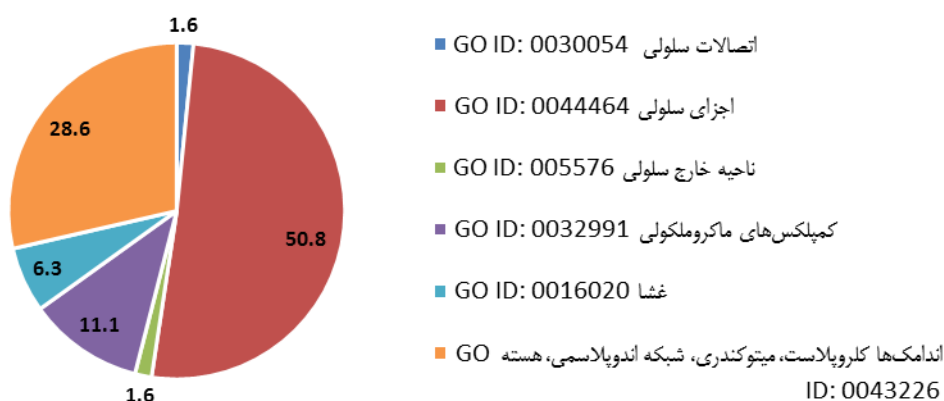


(ف)

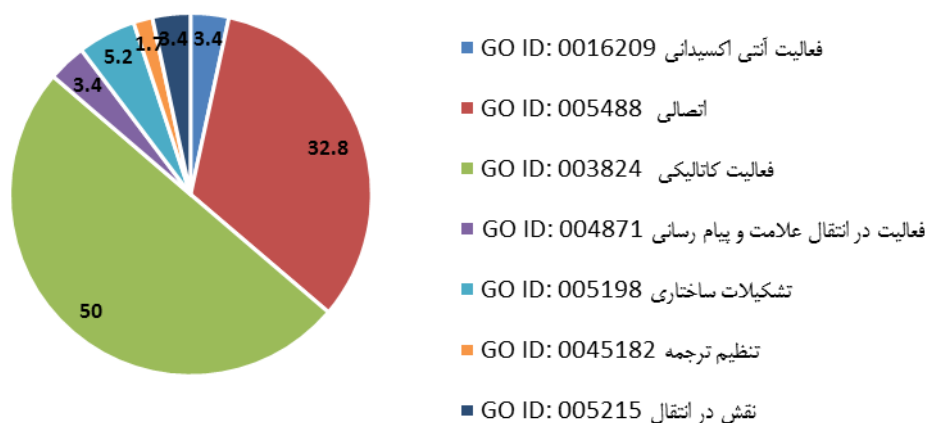


(ب)

شکل ۱. الف) آنالیز هم‌بندی ژن‌های شناسایی شده مسئول سرما. تعداد ۵۰ ژن از ۶۵ ژن شناسایی شده با همبستگی بالای ۰/۶۴ در آنالیز استفاده شد. خط‌های بین ژن‌ها ارتباط متقابل را نشان می‌دهد. ب) شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین ژن‌های شناسایی شده مسئول سرما. (مشخصات کامل ژن‌ها در جدول ۲ آورده شده است).



(الف)



(ب)

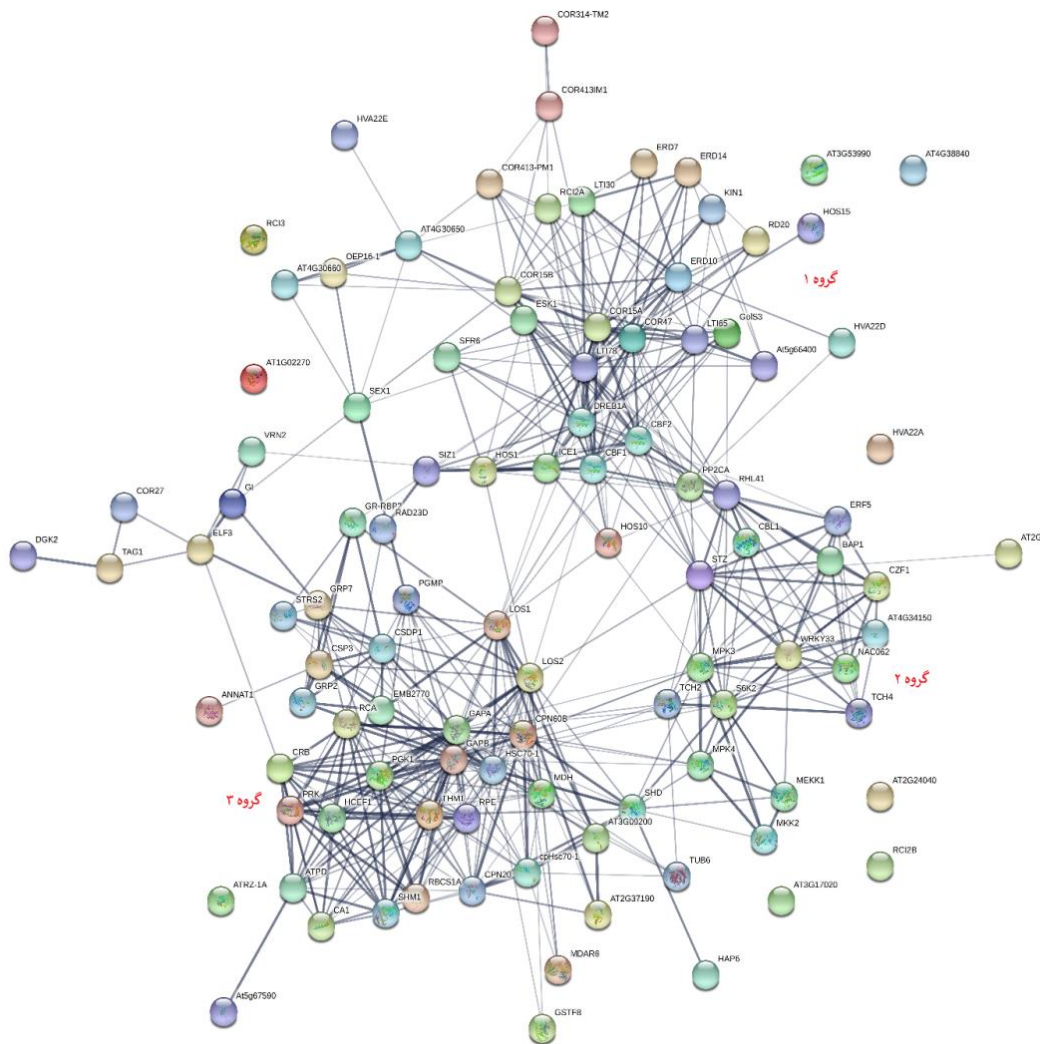
شکل ۲. نمودار دایره‌ای نتایج هستی‌شناسی ژن‌های هم‌بیان با استفاده از Cytoscape. الف) مکان سلولی ژن‌های هم‌بیان. ب) عملکرد مولکولی ژن‌های هم‌بیان.

منجر به افزایش تحمل به تنش‌ها شوند (Bohnert & Cushman, 2002). از این‌رو، مکانیسم مولکولی مقاومت و سازگاری به سرما بسیار حائز اهمیت است. شناسایی ژن‌های جدید، تعیین الگوی تظاهر آن‌ها در پاسخ به تنش‌ها و درکی دقیق از عملکرد آن‌ها در سازگاری با تنش، پایه‌ای برای تقویت تحمل گیاهان زراعی به تنش را با دستکاری ژنی فراهم می‌کند (Chandra & Tiagi, 2006). برهمکنش پروتئین-پروتئین نقش مهمی در تمامی فرایندهای زیستی ایفا می‌کند. آنالیز شبکه به درک سازوکار زیستی موجود از راه آشکار نمودن الگو و یا الگوهای شبکه‌های سلولی عملکردی کمک می‌کند (Raman, 2010). هم‌بیانی و برهمکنش پروتئین‌های پیش‌بینی‌شده

تعداد ۹۸ ژن هم‌بیان ژن‌های شناسایی‌شده مسئول سرما، از نظر عملکردی در ۷ دسته و از نظر مکان سلولی در ۶ دسته قرار داشتند (شکل ۲). ۵۰/۸ و ۲۸/۶ درصد از ژن‌های هم‌بیان به ترتیب پروتئین‌های کدکننده اجزای سلولی و اندامک‌ها بودند. از نظر عملکردی نیز ۵۰ درصد ژن‌های کدکننده پروتئین‌های کاتالیکی و ۳۲/۸ درصد ژن‌های کدکننده پروتئین‌های اتصال‌ی بودند (شکل ۲). ژن‌های بسیاری به‌منظور تحمل سرما از راه تولید پروتئین‌های تقویت‌کننده سازگاری هم‌چون اسمولیت‌ها و هم‌چنین تغییر در انتقال پیام و رونویسی و ترجمه ژن‌ها در گیاه تظاهر می‌یابند (Yu et al., 2010). این عکس‌العمل‌ها ممکن است

متابولیسم کرین، فراوری پروتئین و تنظیم رونویسی در پاسخ به سرما نقش دارند. پروتئین‌های CFBP1، Phosphoribulokinase، PGK1، GAP1 و Thioredoxin M1 (Lee *et al.*, 2006) و FRO1 و LOS2 (Obara *et al.*, 2002) و SHM1 (Engel *et al.*, 2011) و RBG2 (Kim *et al.*, 20078) و MDAR5 (Lee *et al.*, 2002) در مسیر تنفسی، از ژن‌های هم‌بیانی بودند که این یافته‌ها حاکی از اهمیت چرخه‌های فتوسنتزی کلروپلاستی و تنفسی میتوکندریایی در پاسخگویی گیاه به سرما دارد (شکل ۳).

دخیل در سرما، مشارکت مسیرهای متابولیکی ویژه‌ی پاسخ به سرما در گیاه را نشان می‌دهد. شبکه برهمکنش پروتئینی، پروتئین‌ها را در سه کلاستر نشان می‌دهد (شکل ۳). گروه اول شامل ۲۹ ژن با فعالیت اتصالی و کاتالیکی در مسیر بیوستنز کوتین و وکس (ath00073) و پیام‌رسانی و انتقال علامت (ath04016) و متابولیسم گالاکتوز (ath00052) در بخش‌های غشایی و اندامکی سلول بود. گروه دوم با ۱۷ ژن فعالیت‌های کاتالیکی و انتقال علامت در مسیر پیام‌رسانی MAPK نقش دارند و گروه سوم (۴۶ ژن) با فعالیت آنتی‌اکسیدانی، اتصالی، کاتالیکی در



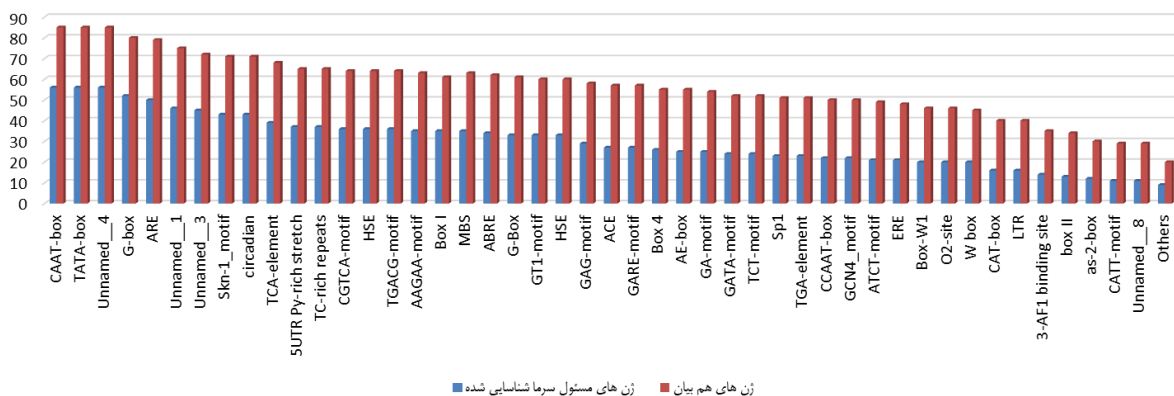
شکل ۳. شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین مرتبط با پروتئین‌های سرما و هم‌بیان‌های آن‌ها که با STRING 10.1 رسم شده است.

در این بررسی تعداد ۵۶ ژن مسئول سرما در خانواده براسیکاسه با استفاده از روش‌های مبتنی بر وب و نرم‌افزارهای آنلاین بررسی و پیش‌بینی شدند. نتایج حاکی از حضور عناصر سیس معمول پاسخ به سرما در پروموتور تمامی ژن‌های پیش‌بینی شده بود که در مسیرهای مختلف زیستی مانند چرخه کالوین، تنفس سلولی و مسیرهای انتقال پیام در بخش‌های مختلف سلول قرار داشتند. بررسی هم‌بیانی ژن‌های پیش‌بینی‌شده، اثر متقابل ژن‌ها را با همبستگی بالای ۰/۶۴ نشان داد. بررسی پروموتور، شبکه برهمکنش پروتئین- پروتئین و بررسی فاکتورهای رونویسی دخیل در تنظیم رونویسی ۵۶ ژن شناسایی شده و ۹۸ ژن هم بیان آن‌ها حاکی از سازوکار مولکولی و مسیرهای مشابه و مشترک پاسخ به تنش سرما در گیاه بوده و می‌تواند ژن‌های کاندید جهت بررسی را معرفی و پس از تایید برای بهره‌برداری در برنامه‌های اصلاحی و مهندسی ژنتیک کلزا به کار رود.

سپاسگزاری

از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (Iran National Science Foundation) (INSF) برای حمایت مالی از این پروژه (شماره طرح: ۹۵۸۱۴۲۸۶) سپاسگزاری می‌شود.

تعدادی از پروتئین‌ها در شبکه شامل پروتئین‌های PXG3 (Partridge & Murphy, 2009) و DGK2 (Gomez-Merino *et al.*, 2004) (انتقال علامت مرتبط با سرما)، ATPK2 (Mizoguchi *et al.*, 1996) (پروتئین کیناز در مسیر انتقال علامت در تنش سرما)، GI (Cao & Jiang, 2005) (مسیر انتقال علامت نمو، گلدهی و فیتوکروم)، CBL1 (Cheong *et al.*, 2003) (گیرنده کلسیم در مسیر انتقال علامت پاسخ به تنش‌های غیرزیستی)، MPK3 (Mizoguchi *et al.*, 1996) و CPN20 (Kawamura & Uemura, 2003) و PP2CA (Lee *et al.*, 2005) (در مسیر انتقال علامت ABA)، MED16 (Knight *et al.*, 2009) (مسیر انتقال علامت جاسمونیک اسید و اتیلن)، MPK4 (Teigne *et al.*, 2004) (پروتئین کیناز در مسیر انتقال علامت)، BCA1 (Goulas *et al.*, 2006) (مسیر انتقال علامت CO₂) بودند (شکل ۳) که نشان‌دهنده مشارکت مسیرهای پیام‌رسانی مختلف هورمونی و غیرهورمونی در پاسخ به سرما هستند. بنابراین، بررسی هم‌بیانی و هم‌چنین آنالیز پروموتور ژن‌های هم بیان و حضور عناصر سیس مشابه در ژن‌های شناسایی‌شده و ژن‌های هم‌بیان آن‌ها، شرکت فاکتورهای رونویسی یکسان و مسیرهای متابولیکی مشترک را در پاسخ به سرما نشان می‌دهد.



شکل ضمیمه ۱. عناصر سیس موجود در ۵۶ ژن مسئول سرما و ۹۸ هم بیان آن‌ها به همراه فراوانی هر یک. ژن‌های با فراوانی کمتر از ۹ (برای ژن‌های شناسایی‌شده) و کمتر از ۲۰ (برای ژن‌های هم‌بیان) به دلیل محدودیت جا نشان داده نشده‌اند.

REFERENCES

- Agarwal P, Reddy MK, Spoty, K (2006) Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant. Cell. Rep.* 25: 1263-1274.
- Ali Q, Ahsan M, Waseem M, Nadeem T, Muhammad H, Elahi M, Farooq J (2011) Gene expression and functional genomic approach for abiotic stress tolerance in different crop species. *IJAVMS*.2:221-248.
- Andaya VC, Mackill DJ (2003) Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice. *J. Exp. Bot.* 54: 2579-2585.
- Bae MS, Cho EJ, Choi EY, Park OK (2003) Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant. J.* 36(5):652-63.
- Breton G, Danyluk J, Frenette Charron J, Sarha, F (2003) Expression profiling and bioinformatic analyses of a novel stress-regulated multispinning transmembrane protein family from cereals and Arabidopsis. *Plant. Physiol.* 132: 64-74.
- Bohnert HJ, Cushman JC (2002) Plants and environmental stress adaptation strategies in: *Plant Biotechnology and Transgenic Plants*. New York: Marcel Dekker.635-664.
- Cao S, Ye M, Jiang S (2005) Involvement of GIGANTEA gene in the regulation of the cold stress response in Arabidopsis. *Plant. Cell. Rep.* 24:683-690.
- Capel J, Jarillo JA, Salinas J, Maritnez-Zapater JM (1997) Two homologous low- temperature- inducible genes from Arabidopsis encode highly hydrophobic proteins. *Plant. Physiol.* 115: 569-576.
- Chandra A, Tyagi, A (2006) Isolation of stress responsive *Psb A* gene from rice (*Oryza sativa* L.) using differential display. *IJBB.* 43: 244-246.
- Cheong YH, Kim KN, Pandey GK, Gupta R, Grant JJ, Luan S (2003) CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in Arabidopsis. *Plant Cell.* 15: 1833-1845.
- Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee BH, Hong X, Agarwal M, Zhu JK (2003) ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes. Dev.* 17(8): 1043-1054.
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends. Plant. Sci.* 12: 444-451.
- Chow CN, Zheng HQ, Wu NY, Chien CH, Huang HD, Lee TY, Chiang-Hsieh YF, Hou PF, Yang TY, Chang WC (2015) PlantPAN 2.0: an update of plant promoter analysis navigator for reconstructing transcriptional regulatory networks in plants. *Nucleic. Acids. Res.*1, 10-35.
- Chu B, Peter Snustad D, Carter JV (1993) Alteration of P-Tubulin Gene Expression during Low-Temperature Exposure in Leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Physiol.* 103: 371-377.
- Dai X, Xu Y, Ma Q, Xu W, Wang T, Xue Y, Chong, K (2007) Overexpression of a R1R2R3 MYB Gene, OsMYB3R-2, Increased tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic Arabidopsis. *Plant. Physiol.* 143: 1-13.
- Davuluri RV, Sun H, Palaniswamy SK, Matthews N, Molina C, Kurtz M, Grotewold E (2003) AGRIS: Arabidopsis Gene Regulatory Information Server an information resource of Arabidopsis *cis*-regulatory elements and transcription factors. *BMC. Bioinformatic.* 4:25.
- Delk NA, Johnson KA, Chowdhury NI, Braam J (2005) CML24, regulated in Expression by Diverse Stimuli, Encodes a Potential Ca²⁺ Sensor That Functions in Responses to Abscisic Acid, Daylength, and Ion Stress. *Plant. Physiol.* 139: 240-253.

- Dong MA, Farre EM, Thomashow MF (2011) Circadian clock-associated 1 and late elongated hypocotyl regulate expression of the C-repeat binding factor (CBF) pathway in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:7241-7246.
- Drea SC, Lao NT, Wolfe KH, Kavanagh T (2006) Gene duplication, exon gain and neofunctionalization of OEP16-related genes in land plants. *Plant. J.* 46: 723-735.
- Du C, Hu K, Xian S, Liu C, Fan J, Tu J, Fu T (2016) Dynamic transcriptome analysis reveals AP2/ERF transcription factors responsible for cold stress in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Mol Genet Genomics.* 291(3): 1053-67.
- Engel N, Ewald R, Gupta KJ, Zrenner R, Hagemann M, Bauwe H (2011) The pre-sequence of Arabidopsis serine hydroxymethyltransferase SHM2 selectively prevents import into mesophyll mitochondria. *Plant. Physiol.* 157: 1711-1720.
- Furuya T, Matsuoka D, Nanmori, T (2013) Phosphorylation of Arabidopsis thaliana MEKK1 via Ca(2+) signaling as a part of the cold stress response. *J. Plant. Res.* 126(6):833-40. doi: 10.1007/s10265-013-0576-0.
- Goulas E, Schubert M, Kieselbach T, Kleczkowski LA, Gardeström P, Schröder W, Hurry V (2006) The chloroplast lumen and stromal proteomes of Arabidopsis thaliana show differential sensitivity to short- and long-term exposure to low temperature. *Plant. J.* 47(5):720-34. DOI:10.1111/j.1365-313X.2006.02821.x
- Gomez-Merino FC, Brearley CA, Ornatowska M, Abdel-Halim ME, Zanol MI, Mueller-Roeber (2004) AtDGK2, a novel diacylglycerol kinase from Arabidopsis thaliana, phosphorylates 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol and 1,2-dioleoyl-sn-glycerol and exhibits cold-inducible gene expression. *B. J. Biol. Chem.* 279:8230-8241.
- Hieno A, Naznin HA, Hyakumachi M, Sakurai T, Tokizawa M, Koyama H, Sato N, Nishiyama T, Hasebe M, Zimmer AD, Lang D, Reski R, Rensing SA, Obokata J, Yamamoto YY (2014) ppdb: plant promoter database version 3.0. *Nucleic. Acids. Res.* 42, 1188-92.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucl. Acids. Res.* 27(1): 297-300.
- Hossain MA, Chob JI, Han M, Ahn CH, Jeon JS, An G, Park PB (2010) The ABRE-binding bZIP transcription factor OsABF2 is a positive regulator of abiotic stress and ABA signaling in rice. *J. Plant Phys.*
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann, P (2008) *Genevestigator* V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv. Bioinformatic.*
- Ishitani M, Xiong L, Lee H, Stevenson B, Zhu JK (1998) *HOS1*, a Genetic Locus Involved in Cold-Responsive Gene Expression in Arabidopsis. *Plant Cell.* 10: 1151-1161.
- Jing M, Meng-Yao L, Wang F, Tang J, Xiong AS (2015) Genome-wide analysis of Dof family transcription factors and their responses to abiotic stresses in Chinese cabbage. *BMC. Genomics.* 16(1): 33. doi:10.1186/s12864-015-1242-9.
- Jiang C, Iu B, Singh J (1996) Requirement of a CCGAC cis-acting element for cold induction of the *BN115* gene from winter *Brassica napus*. *J. Plant. Mol. Biol.* 30: 679- 684.
- Kanehisa Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K (2017) KEGG: new perspectives on genomes, pathways,

- diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 45, D353-D361.
- Karlson D, Imai, R (2003) Conservation of the Cold Shock Domain Protein Family in Plants. *Plant Physiol.* 131: 12-15.
- Kawamura Y, Uemura M (2003) Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves associated with cold acclimation. *Plant J.* 36: 141-154.
- Kaur G, Pati PK (2016) Analysis of *cis*-acting regulatory elements of Respiratory burst oxidase homolog (Rboh) gene families in *Arabidopsis* and rice provides clues for their diverse functions. *Comput Bio and Chem.* 62: 104-18.
- Kim JY, Park SJ, Jang B, Jung CH, Ahn SJ, Goh CH, Cho K, Han O, Kang H (2007) Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *Plant J.* 50: 439-451.
- Kim MH, Sasaki K, Imai RJ (2009) Cold shock domain protein 3 regulates freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Chem.* 284: 23454-23460.
- Kim JS, Kim KA, Oh TR, Park CM, Kang H (2008) Functional characterization of DEAD-box RNA helicases in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *Plant Cell Physiol.* 49(10): 1563-71. doi: 10.1093/pcp/pcn125.
- Kim YO, Kim JS, Kang H (2005) Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 42: 890-900.
- Kimura M, Yamamoto YY, Seki M, Sakurai T, Sato M, Abe T, Yoshida S, Manabe K, Shinozaki K, Matsui, M (2003) Identification of *Arabidopsis* genes regulated by high light-stress using cDNA microarray. *Photochem. Photobiol.* 77(2): 226-33.
- Knight H, Mugford SG, Ulker B, Gao D, Thorlby G, Knight MR (2009) Identification of SFR6, a key component in cold acclimation acting post-translationally on CBF function. *Plant J.* 58: 97-108.
- Kurkela S, Franck M (1990) Cloning and characterization of a cold- and ABA-inducible *Arabidopsis* gene. *Plant Mol Biol.* 15(1): 137-44.
- Kwak KJ, Kim YO, Kang H (2005) Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress. *J. Exp. Bot.* 56: 421. 3007-3016. doi:10.1093/jxb/eri298.
- Liang C, Zong, H, Ren, F, Gue, QQ, Hu XP, Li XB (2011) A novel cold-regulated gene, COR25, of *Brassica napus* is involved in plant response and tolerance to cold stress. *Plant Cell Rep.* 30: 463-471.
- Lee BH, Lee H, Xiong L, Zhu JK (2002) A mitochondria complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression. *Plant Cell.* 14: 1235-1251.
- Lee BH, Henderson DA, Zhu JK (2005) The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and regulation by ICE1. *Plant Cell.* 17:3155-3175.
- Lee H, Guo Y, Ohta M, Xiong L, Stevenson B, Zhu JK (2002) LOS2, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase. *EMBO J.* 11: 2692-2702.
- Lee BH, Kapoor A, Zhu J, Zhu JK (2006) Stabilized1, a Stress-Upregulated Nuclear Protein, Is Required for Pre-mRNA Splicing, mRNA Turnover, and Stress Tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 18: 1736-1749.
- Lee JH, Kim JJ, Kim SH, Cho HJ, Kim J, Ahn JH (2012) The E3 ubiquitin ligase HOS1 regulates low ambient temperature responsive flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 53(10): 1802-14. doi: 10.1093/pcp/pcs123.

- Lescot M, Dhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y (2002) PlantCARE a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic. Acids. Res.* 30(1): 325-327.
- Liorente F, Lopez-Cobollo RM, Catala R, Martinez-Zapater JM, Salinas J (2002) A novel cold-inducible gene from *Arabidopsis*, RCI3, encodes a peroxidase that constitutes a component for stress tolerance. *Plant J.* 32(1): 13-24.
- Malia A, Donga B, Eva M, Farréb, M, Thomashow F (2011) Circadian Clock-Associated 1 and Late Elongated Hypocotyl regulate expression of the C-REPEAT binding factor (CBF) pathway in *Arabidopsis*. *PNAS.* 7241-7246
- Messing SAJ, Gabelli SB, Echeverria I, Vogel JT, Guan JC, Tan BC, Klee HJ, McCarty DR, Amzel LM (2010) Structural insights into maize *Viviparous14*, a key enzyme in the biosynthesis of the phytohormone abscisic acid. *Plant Cell.* 22: 2970-2980.
- Mizoguchi T, Iriet K, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi-shinozaki K, Matsumoto K, Shinozaki K (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activate protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Biol.* 93: 765-769.
- Mizoguchi T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Kamada H, Shinozaki K (1995) Two genes that encode ribosomal-protein S6 kinase homologs are induced by cold or salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS. Lett.* 23: 358(2): 199-204.
- Nordin K, Vahala T, Pavala ET (1993) Differential expression of two related, low-temperature-induced genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant. Mol. Bio.* 21: 641-653.
- Obara K, Sumi K, Fukuda H (2002) The use of multiple transcription starts causes the dual targeting of *Arabidopsis* putative monodehydroascorbate reductase to both mitochondria and chloroplasts. *Plant. Cell. Physiol.* 43:697-705.
- Obayashi T, Aoki Y, Tadaka S, Kagaya Y, Kinoshita K (2018) ATTED-II in 2018: A plant co-expression database based on investigation of statistical property of the mutual rank index. *Plant. Cell. Physiol.* 59, e3.
- Okawa K, Nakayama K, Kakizaki T, Yamashita T, Inaba T (2008) Identification and characterization of Cor413im proteins as novel components of the chloroplast inner envelope. *Plant. Cell. Environ.* (10):1470-1483. doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01854.x.
- Omez-erino FC, Brearly CA, Oranatowska M, Abdel-Haliem ME, Zanol MI, Mueller-Roeber B (2004) *AtDGK2*, a novel diacylglycerol kinase from *Arabidopsis thaliana*, phosphorylates 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol and 1,2-dioleoyl-sn-glycerol and exhibits cold-inducible gene expression. *J. Biol. Chem.* 279: 8230-8241.
- Orvar BL, V. Sangwan F, Omann R, Dhindsa S (2000) Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* 23: 785-794.
- Partridge M, Murphy DJ (2009) . Roles of a membrane-bound caleosin and putative peroxygenase in biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *Biochem.* 47: 796-806.
- Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell.* 6: 65-74.
- Puhakainen T, Hess MW, Mäkelä P,

- Svensson J, Heino P, Palva ET (2004) Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant. Mol. Biol.* 54(5): 743-53.
- Peleg Z, Blumwald E (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr Opin Plant Biol.* 14(3): 290-295.
- Raman K (2010) Construction and analysis of protein-protein interaction networks. *Autom. Express.* 2(1): 2.
- Roy S (2016) Function of MYB domain transcription factors in abiotic stress and epigenetic control of stress response in plant genome. *Plant. Signal. Behav.* 11(1): e1117723.
- Reye JL, Campos F, Wei H, Arora R, Yang Y, Karlson DT, Covarrubias AA (2008) Functional dissection of hydrophilins during in vitro freeze protection. *Plant. Cell. Environ.* 31(12):1781-90. doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01879.x.
- Santner A, Estelle M (2009) Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature.* 459: 1071-1078.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13(11): 2498-2504.
- Liu S, Snowdon R, Chalhoub B. 2018. *The Brassica napus Genome*. Springer. ISBN 978-3-319-43694-4.
- Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, Santos A, Doncheva NT, Roth A, Bork P, Jensen LJ, Mering C (2017) The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic. Acids. Res.* 45: 362-368.
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant. J.* 29: 417-426.
- Teige M, Scheikl E, Eulgem T, Doczi R, Ichimura K, Shinozaki K, Dangl JL, Hirt H (2004) The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol. Cell.* 15: 141-152.
- Ujjal J, Phukan G, Jeena S, Rakesh K, Shukla (2016) WRKY Transcription Factors: Molecular Regulation and Stress Responses in Plants. *Front. Plant. Sci.* 7: 7603. doi: 10.3389/fpls.2016.00760
- Vergnolle C, Vaultier M, Tacconat, L, Renou JP, Kader JC, Zachowski A, Ruelland E (2005) The Cold-Induced Early Activation of Phospholipase C and D Pathways Determines the Response of Two Distinct Clusters of Genes in *Arabidopsis* Cell Suspensions. *Plant. Physiol.* 139: 1217-1233.
- Wang YJ, Zhang ZG, He XJ, Zhou HL, Wen YX, Dai JX, Zhang JS, Chen SY (2003) A rice transcription factor OsbHLH1 is involved in cold stress response. *Theor. Appl. Genet.* 107(8): 1402-1409.
- Wittkopp PJ, Kalay G (2012) cis-regulatory elements: molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence. *Nat. Rev. Genet.* 13: 59-69.
- Wood CC, Robertson M, Tanner G, Peacock WJ, Dennis ES, Helliwell CA (2006) The *Arabidopsis thaliana* vernalization response requires a polycomb-like protein complex that also includes vernalization insensitive 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 14631-14636.
- Xin Z, Browse J (1998) *eskimo1* mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. *Plant. Biol.* 95: 7799-7804.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki, K

- (2005) Organization of *cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold stress-responsive promoters. *Trends. Plant. Sci.* 10: 88-94.
- Yano R, Nakamura M, Yoneyama T, Nishida I (2005) Starch-Related α -Glucan/Water Dikinase Is Involved in the Cold-Induced Development of Freezing Tolerance in Arabidopsis. *Plant. Physiol.* 138: 837-846.
- Yang J, Wan XL, Zhang JW, Bao MZ (2016) Identification and expression analysis of nuclear factor Y families in *Prunus mume* under different abiotic stresses. *Biologia Plantarum.* 60: 419-426.
- Yu SM, Chin-Fen S, Wang YC, Hsieh TH, Lu CA, Tseng TH (2010) A Novel MYBS3-Dependent pathway confers cold tolerance in Rice. *Plant. Phys.* 153: 145-158.
- Yuan Q, Zhang C, Zhao T, Yao M, Xu X (2016) A genome-wide analysis of GATA transcription factor family in tomato and analysis of expression patterns. *Int. J. Agric. Biol.* 00: 000-000.
- Yo K, Kim SJ, Kang H (2005) Cold-inducible zing finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in Arabidopsis Thaliana. *Plant J.* 42(6): 890-900.
- Zhu J, Jeong JC, Zhu Y, Sokolchik I, Miyazaki S, Zhu JK, Hasegawa PM, Bohnert HJ, Shi H, Yun DJ, Bressan RA (2008) Involvement of Arabidopsis HOS15 in histone deacetylation and cold tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 4945-4950.
- Zhu J, Verslues PE, Zheng X, Lee BH, Zhan X, Manabe Y, Sokolchik I, Zhu Y, Dong CH, Zhu JK, Hasegawa PM, Bressan RA (2010) Retraction for Zhu *et al.*, HOS10 encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 13972-13972.
- Zybailov B, Rutschow H, Friso G, Rudella A, Emanuelsson O (2008) Sorting Signals, N-Terminal Modifications and Abundance of the Chloroplast. Proteome. *PLoS ONE.* 3(4): e1994. doi:10.1371/journal.pone.0001994.