Archiv

Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Identification of a number of genes with different expression patterns between resistant and susceptible wheat cultivars in response to drought stress by using meta-analysis method

Sahar Shojaee
Student of MSc in Biotechnology, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Email: sshojaee8@gmail.com

Rudabeh Ravash
*Assistant Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Email: r.ravash@gmail.com

Behrouz Shiran
Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Email: beshiran45@gmail.com

Esmaeil Ebrahimie
Associate Professor, Department of Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran. Email: esmaeil.ebrahimie@adelaide.edu.au

Abstract

Objective

The wheat is one of the most important sources of human food. In production of this product abiotic stresses such as drought, salinity, temperature, etc., involved in cultivation. Therefore, identification and evaluation of genes involved in stress resistance in this plant is very importance. Aim of this study was identifying responsive genes to drought and their expression variation in, resistant and susceptible wheat.

Materials and methods

The data available on the NCBI GEO microarray data were collected in 2018. The libraries were belonging to drought resistant and drought susceptible wheat under stress

www.SID.ir

Archive of SID

and control conditions. Using meta-analysis, altered genes expressed under stress conditions were identified for each group of cultivars. Significantly expressed altered genes were identified, the aci-reductone-dioxygenase-like protein (ARD) gene was evaluated for laboratory confirmation. Leaf sampling was performed in 4-leaf stage at three times 2, 4 and 7 days after stress with a control sample with three biological replications. RNA extraction from leaf samples was performed using RNx ™ -plus extraction solution and Real time PCR reaction using specific primers of d ARD gene.

Result

Among differential expressed genes of resistant cultivars, transcription factors genes were Myb3, ethylene responsive 5a, MIKC-type MADS-box WM24B and salinity inducible ERF4 and in sensitive cultivars, transcription factors such as WRKY15, MADS-box TaAGL8, WRKY39 and Myb have increased expression. By identifying the genes and transcription factors mentioned and changing their expression, wheat cultivars can tolerate drought stress. Real time PCR results of ARD Gene for 6o4 and Sundor, drought resistant and drought susceptible wheat varieties was consistent with the results of the meta-analysis and it confirmed the result.

Conclusion

According to gene expression results and other outcomes of metanalysis in this study, an effective step can be taken in predicting drought resistance and susceptibility in different wheat cultivars.

Key words: drought, meta-analysis, R software, Triticum aestivum.

Citation: Shojaee S, Ravash R, Shiran B, Ebrahimie E (2020) Identification of a number of genes with different expression patterns between resistant and susceptible wheat cultivars in response to drought stress by using meta-analysis method. Agricultural Biotechnology Journal 12 (3), 157-176.

Agricultural Biotechnology Journal 12 (3), 157-176.
DOI: 10.22103/jab.2020.15218.1194
Received: August 15, 2020; Accepted: September 30, 2020
© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University Of Kerman-Iranian Biotechnology Society

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی تعدادی از ژن‌های با الگوی بیان متفاوت بین ارقام مقاوم و حساس گندم در پاسخ به تنش خشکی با استفاده از روش متاآنالیز

سحر شجاعی
دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، کدپستی: ۸۸۱۸۶۳۴۱۴۱، شهرکرد، ایران. ایمیل: sshojaee8@gmail.com

رودابه راوش
*نویسنده مسئول، استادیار، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، کدپستی: ۸۸۱۸۶۳۴۱۴۱، شهرکرد، ایران. ایمیل: r.ravash@gmail.com

بهروز شیران
استاد ، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، کدپستی: ۸۸۱۸۶۳۴۱۴۱، شهرکرد، ایران. ایمیل: beshiran45@gmail.com

اسماعیل ابراهیمی
دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، کدپستی: ۸۴۳۳۴ – ۷۱۹۴۶، شیراز، ایران. ایمیل: esmaeil.ebrahimie@adelaide.edu.au

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۲۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۹

چکیده

هدف: گندم از مهمترین منابع غذایی بشر می‌باشد که در تولید این محصول، تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، شوری، دما و غیره دخیل می‌باشند. از این رو شناسایی و ارزیابی ژن‌های دخیل در مقاومت به تنش‌ها در این گیاه از اهمیت بالایی برخوردار است. این تحقیق با هدف شناسایی ژن‌های پاسخ دهنده به خشکی و بررسی تفاوت بیان آنها در گندم حساس و مقاوم به خشکی، انجام شد.

مواد و روش‌ها: از بین داده‌های موجود در سایت NCBI GEO در سال ۲۰۱۸ داده‌های ریزآرایه مورد نظر جمع‌آوری شدند. کتابخانه‌های تهیه شده دارای ارقام مقاوم و حساس به خشکی، تحت دو شرایط تنش و کنترل بودند. با استفاده از متاآنالیز، ژن‌های تغییر بیان‌یافته تحت شرایط تنش برای هر گروه از ارقام شناسایی شد. از ژن‌های تغییر بیان یافته معنی‌دار شناسایی شده، ژن دئوکسی ژنز کاهش‌دهنده شبه‌پروتئین aci (ARD) برای تایید آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌برداری از برگ‌ها در مرحله ۴ برگی و در سه زمان ۲، ۴ و ۷ روز بعد از اعمال تنش همراه با نمونه‌ی کنترل، با سه تکرار بیولوژیکی انجام گرفت. استخراج RNA از نمونه‌های برگی با استفاده از محلول استخراج RNx™-plus و واکنش Real time PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن ARD انجام گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج: در بین پروب‌های تغییر بیان‌یافته، به ترتیب ۶۵۸ و ۱۵۶۱پروب ایدی به طور اختصاصی در ارقام مقاوم و حساس، در شرایط تنش افزایش بیان داشتند. ژن‌های فاکتورهای رونویسی Myb3، ethylene responsive 5a، MIKC-type MADS-boxWM24B و salinity inducible ERF4 در ارقام مقاوم و فاکتورهای رونویسی WRKY15، MADS-box TaAGL8، WRKY39و Myb در ارقام حساس دارای افزایش بیان معنی‌داری بودند. با کمک متاآنالیز ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی، با بیان متفاوت بین ارقام حساس و مقاوم گندم شناسایی شدند و از این نتایج، می‌توان برای شناسایی ارقام مقاوم و حساس گندم نسبت به تنش خشکی استفاده کرد. نتایج Real time PCR ژن ARD برای ۲ رقم گندم مقاوم به خشکی 6o4 و رقم حساس به تنش خشکی Sundor همسو با نتایج متاآنالیز انجام شده بود و نتیجه‌ی متاآنالیز را تایید کرد.

نتیجه‌گیری: با توجه به بررسی رفتار بیانی این ژن و دیگر نتایج بدست آمده متاآنالیز در این مطالعه ، می‌توان گامی موثر در پیش‌بینی مقاومت و حساسیت به خشکی در ارقام مختلف گندم برداشت.

کلید واژه‌ها: تنش خشکی، متاآنالیز، نرم‌افزار R، Triticum aestivum

مقدمه

تنش خشکی در مناطق خشک و نیمه‌خشک به عنوان مهم‌ترین عامل محدودکننده تولید محصولات کشاورزی می‌باشد (Delmer 2005; Rajala et al. 2009; Marti & Slafer 2014)، بطوریکه با توجه به تغییر اقلیم و گرم شدن کره‌زمین در طی دهه‌های آینده، در مناطق خشک و نیمه‌خشک کاهش عملکرد محصولات کشاورزی در اثر خشکسالی بیش از ۵۰ درصد برآورد شده است (Jha et al. 2014). مقاومت نسبت به خشکی صفتی کمی است و روش اندازه‌گیری مستقیمی برای آن وجود ندارد. این امر باعث دشواری شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی می‌شود (Takeda & Matsuoka 2008). بنابراین شناسایی عوامل موثر در رشد و نمو گیاهان به منظور مقابله با تنش‌های موجود و افزایش عملکرد برای دستیابی به ایجاد گیاهان متحمل ضروری می‌باشد (Vafabakhsh et al. 2009). افزایش تولید گیاهان زراعی برای هماهنگی با تقاضای روزافزون منابع غذایی اجتناب‌ناپذیر است. افزایش تولید گیاهان باعث استفاده و فشار بیش از حد بر منابع پایه کشاورزی گردیده و پایداری این سیستم‌ها را تهدید می‌کند. از آنجایی که غلات مهمترین منابع تأمین کننده غذای بشر می‌باشند، عوامل تاثیرگذار بر روی محصولات این گیاهان حائز اهمیت می‌باشد. در بین غلات، گندم یکی از مهمترین گیاهانی می‌باشد که مورد استفاده انسان قرار می‌گیرد. تنش‌های غیرزنده مانند خشکی، شوری، دما تاثیر منفی قابل ملاحظه‌ای در تولید گندم دارند. خشکی یکی از مهمترین تنش‌های محیطی است که تولید بسیاری از محصولات زراعی را به طور نامطلوبی تحت تأثیر قرار می‌دهد و به دلیل تغییرات اقلیمی زمین ضرورت تولید گیاهان متحمل نسبت به این تنش احساس شده‌است. از این رو شناسایی و بررسی ژن‌هایی که در ایجاد این تحمل در گیاهان دخیل هستند مهم می‌باشد. از روش‌های جامع برای شناسایی ژن‌ها، روش متاآنالیز می‌باشد. اصطلاح

www.SID.ir

Archive of SID

فراتحلیل (متاآنالیز) برای نخستین بار توسط Glass (1976) در انجمن پژوهشی آموزشی آمریکا بکار گرفته شد. هدف متاآنالیز به دست آوردن اطلاعات بیشتر از اطلاعات موجود است که با روی هم ریختن نتایج مطالعه‌های کوچکتر و با یک یا چند آنالیز آماری حاصل می‌شود. به این ترتیب، نتایجی که ممکن است در مطالعه‌های کوچکتر کشف نشود با استفاده از متاآنالیز ده‌ها مطالعه کوچک قابل حصول خواهد بود. نیاز به جمع‌بندی تحقیق‌های مختلف از قبل مورد توجه بوده‌است (Glass 1976). برای بهبود تحمل به خشکی، Budak et al. (2013) ژن‌های متحمل به خشکی TaCP، TaABC1، TaEXPR23، WRKY2 را معرفی کردند. در مطالعه دیگری هفت عضو از خانواده WRKY، با توجه به بیان افتراقی آن‌ها در پاسخ به تنش خشکی در ارقام حساس و متحمل گندم، بعنوان ژن‌های منتخب برای افزایش تحمل به خشکی در گندم انتخاب شدند (Khezry et al. 2015). مطالعات آنتولوژی ژن‌ها و آنالیز مسیر، ژن‌های مشترک را به دسته‌های کاربردی مرتبط با فرآیندهای متابولیکی (بعنوان مثال اسید آمینه و متابولیسم کربوهیدرات) ، عملکرد تنظیم (مثلا تجزیه پروتئین و رونویسی) و پاسخ به محرک، طبقه‌بندی می‌کنند. در پژوهشی Shaar-Moshe et al. (2015) بیان کردند که برای شناسایی ژن‌های کلیدی در تنش خشکی و سازوکارها و برای تست حفاظت تکاملی آن‌ها از روش متاآنالیز تلاقی گونه‌ها استفاده کرده‌اند. در این پژوهش از ۱۷ آزمایش ریزآرایه برای گیاهان آرابیدوپسیس، برنج، گندم و جو استفاده گردید. نتایج حاصله وجود ۲۲۵ ژن تغییر بیان‌یافته را در سراسر مطالعات نشان دادند. بر اساس موارد گفته شده هدف از انجام این پژوهش بررسی تعدادی از ارقام حساس و مقاوم به خشکی گندم با استفاده از روش متاآنالیز و شناسایی ژن‌هایی که تغییر بیان معنی‌دار و موثری را داشته‌اند، می‌باشد که طبق مطالعات انجام شده اهمیت این پژوهش استفاده از ارقام حساس و مقاوم و مقایسه‌ی آن‌ها با یکدیگر می‌باشد (Shaar-Moshe et al. 2015).

مواد و روش‌ها

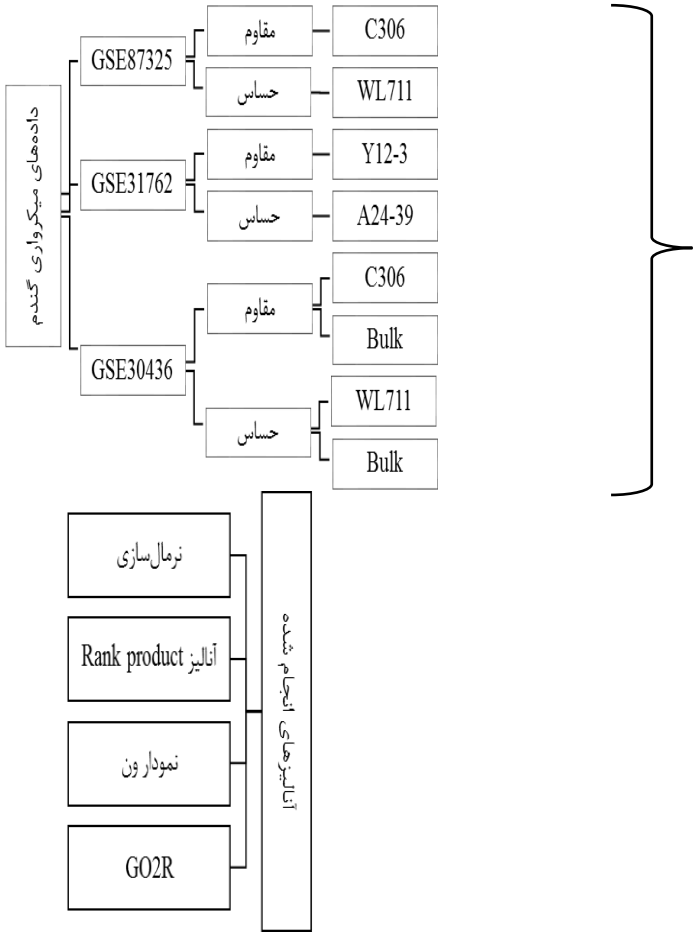
بخش بیوانفورماتیک

تهیه داده‌ها برای متاآنالیز: یکی از بهترین مکان‌های ذخیره مجموعه داده‌های بیان ژن GEO است که در مرکز اطلاعاتی NCBI قرار دارد. این پایگاه اطلاعات بیان ژن‌ها را که با استفاده از روش ریزآرایه‌ها و یا سایر روش‌های بررسی حجم وسیع ژن‌ها، در آزمایشگاه‌های مختلف تولید شده‌اند، در اختیار محققین قرار می‌دهد. تمامی داده‌ها برای انجام این مطالعه از سایت NCBI GEO(Gene Expression Omnibus) جمع‌آوری شده است. کتابخانه‌های دارای ارقام مقاوم و حساس به خشکی در گیاه گندم، در دو شرایط تنش و کنترل با فرمت CEL. تهیه شدند. داده‌های جمع‌آوری شده شامل RNA کل بافت برگ گیاهان مورد مطالعه بودند. کتابخانه‌های گونه‌ی مورد بررسی حاوی ۳ ژنوتیپ حساس و ۳ ژنوتیپ مقاوم بودند. رقم C306 جز ارقام مقاوم به خشکی و شوری و حرارت می‌باشد. این رقم از تلاقی بین ارقام RGN/CSK3//2*C5 91/3/C217/N14 C281// حاصل شده است (Harinder et al. 2019). رقم WL711 گیاهی نیمه پاکوتاه، پرمحصول، حساس به خشکی و

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID

دارای قدرت جوانه‌زنی متوسط می‌باشد (Chopra et al. 2013). ارقام Y12-3 و A24-39 به ترتیب مقاوم و حساس به خشکی می‌باشند. رقم Y12-3 در شرایط تنش خشکی دارای حاصلخیزی، ثبات عملکرد و کارایی مصرف آب بالایی می‌باشد و رقم A24-39 در شرایط تنش خشکی دارای حاصلخیزی، ثبات عملکرد و کارایی مصرف آب پایین می‌باشد (Krugman et al. 2008). فایل تفسیر مربوط به این کتابخانه ها از سایت افی‌متریکس (https://www.affymetrix.com/) دریافت شد، که در کل شامل ۴۴ GSM بود (شکل ۱). تعداد کل پروب‌های استفاده شده برای متاآنالیز ۶۱۲۹۰ بود.



شکل ۱. مراحل تجزیه و تحلیل‌های انجام شده در این تحقیق

Figure 2. The flowchart of step analysis in this study

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir

Archive of SID

نرمال‌سازی داده‌ها: فایل‌هایی با فرمت CEL برای هر کتابخانه دانلود شد و بوسیله‌ی الگوریتم RMA، با استفاده از پکیج affy در نرم‌افزار RStudio (1.1.383 Version) نرمال‌سازی انجام شد. همچنین برای کم کردن میزان هتروژنیسیتی (Batch effects) در میان مطالعات، قبل از تلفیق کتابخانه‌های مختلف، روش تغییر یافته استانداردسازی Z بر روی داده‌ها اعمال گردید (Lipsey & Wilson 2001; Kinoshita & Obayashi 2009; Mohammadi-Dehcheshmeh et al. 2018).

متاآنالیز ریزآرایه : برای انجام متاآنالیز ریزآرایه‌ها از پکیج Rank-Prod در برنامه RStudio (Version 1.1.383) استفاده شده‌است (Hong et al. 2006). برای انجام این کار، داده‌های نرمال‌سازی شده هر نمونه مورد استفاده قرار گرفت. اطلاعات مربوط به گیاهان گندم حساس در دو گروه کنترل و تنش مورد مقایسه قرار گرفتند و همین روند برای گیاهان مقاوم نیز بطور موازی انجام گرفت. ژن‌های با $P\text{-value} \leq 0.05$ به عنوان ژن‌های دارای بیان افتراقی در نظر گرفته شدند و نتایج حاصل برای ارقام حساس و مقاوم براساس شدت بیان ($|Fc| \geq 2$)، در دو گروه افزایش بیان معنی‌دار و کاهش بیان معنی‌دار، قرار گرفتند. همچنین به طور جداگانه نتایج حاصل از مقایسه حالت کنترل و تنش GO2R برای هر کتابخانه بدست آمد.

نمودار ون: از نمودار ون برای پیدا کردن اشتراک‌ها و تفاوت‌ها در بین ژن‌های بیان شده معنی‌دار حاصل از متاآنالیز، استفاده شد. برای رسم این نمودار از پروب‌ایدی‌های ارقام حساس و مقاوم که افزایش یا کاهش بیان معنی‌داری داشته‌اند، در سایت (http:/ http://www.interactivenn.net/) استفاده شد.

تایید آزمایشگاهی بیان ژن شناسایی شده: در این پژوهش ارقام استرالیایی گندم حساس به تنش خشکی Sundor و مقاوم به تنش خشکی 6o4 برای ارزیابی آزمایشگاهی استفاده شد. بعد از کشت این ارقام، در گلخانه‌ی تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد، تنش خشکی بصورت قطع آبیاری در مرحله ۴ برگی، انجام شد. نمونه‌های برگی بطور جداگانه در سه زمان، ۲ روز پس از قطع آبیاری (تنش ضعیف)، ۴ روز پس از قطع آبیاری (تنش متوسط) و یک هفته پس از قطع آبیاری (تنش شدید) همراه با نمونه‌ی کنترل، با دو تکرار بیولوژیکی در ازت مایع جمع‌آوری شدند و در فریزر ۸۰°C- نگه‌داری شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل (فاکتور اول: ۲ ژنوتیپ گندم و فاکتور دوم: ۴ سطح تنش خشکی) با طرح پایه کاملا تصادفی در چهار تکرار اجرا شد. استخراج RNA از نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از کیت RNx™-plus (شرکت سیناکلون، ایران) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. بعد از خالص‌سازی RNAهای استخراج شده cDNA تهیه شد. آغازگرها برای بررسی بیان ژن انتخابی با استفاده از نرم‌افزار primer 3 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) طراحی و در Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) مورد ارزیابی قرار گرفتند. واکنش PCR به وسیله دستگاه Rotor-Gene Q از شرکت کیاژن، با حجم نهایی ۱۲ (۲ میکرولیتر cDNA ، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت و ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت،۶ میکرولیتر سایبرگرین و ۲ میکرولیتر آب مقطر استریل) انجام شد. برنامه واکنش شامل ۹۵ °C به مدت ۱۰ دقیقه

www.SID.ir

Archive of SID

و سپس طی ۴۰ چرخه با ۹۵ °C و زمان ۱۰ ثانیه، ۵۹ °C برای ۱۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۲۰ ثانیه بود. جهت نرمال نمودن داده‌های بدست آمده از Real time PCR از ژن خانه‌دار اکتین به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده گردید (جدول ۱). سنجش تغییرات در بیان ژن ARD با استفاده از روش مقایسه ای دلتا دلتا سی تی ارائه شده توسط لیواک و توماس انجام گرفت (Livak & Schmittgen 2001). تجزیه تغییرات بیان ژن بر پایه مدل آماری طرح کاملا تصادفی با رویه مدل خطی عمودی (General linear model: GLM) و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن (Duncan) در سطح احتمال ۱ درصد ($P\leq0.01$) در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام گرفت.

جدول ۱. آغازگرهای طراحی شده برای انجام real-time PCR

Table 1. Oligonucleotid primers designed for real-time PCR

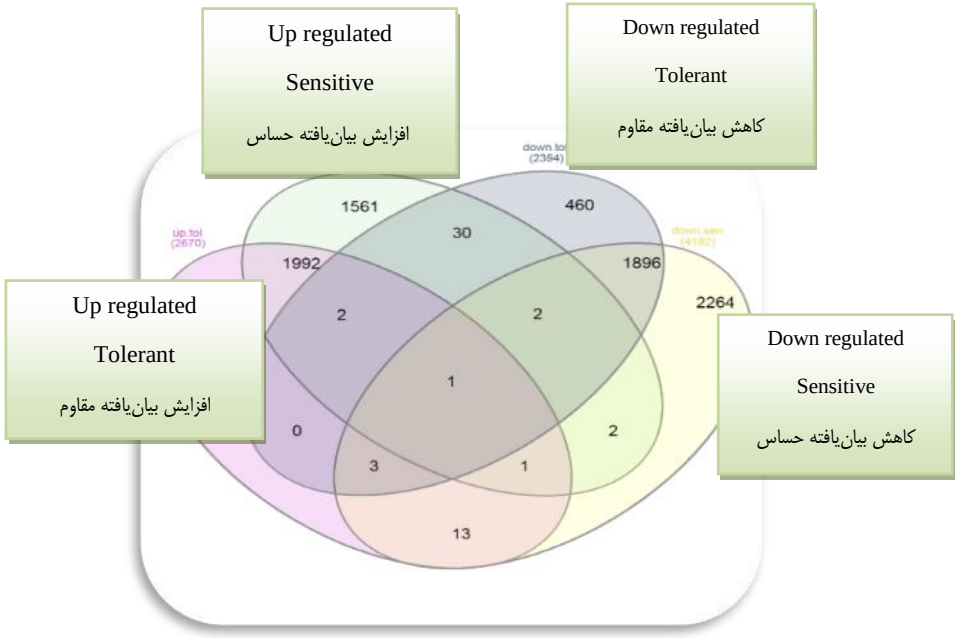
نام پرایمر Primer name	توالی آغازگر (۳'-۵') Sequence of primer (5'-3')	نام ژن Gene name	دمای ذوب Temperature melting (°C)
Aci F	CAAACTATGAGGCCAAGCTGAA	aci-reductone-dioxygenase-like protein	59
Aci R	TCATGCCACCTTTCTTAACTGC		
Actin F	CCTGTGTTGCTGACTGAGGCCCC	Actin	59
Actin R	CCAAACGAAGGATAGCATGAGGAAGCG		

نتایج و بحث

متاآنالیز ریزآرایه‌ها: کتابخانه‌های ژنوتیپ‌های مقاوم C306 و Y12-3 و ژنوتیپ‌های حساس WL711 و A24-39 تهیه شدند. در مجموع تعداد ۲۲ آرایه، ۶۱k پروب‌ایدی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. بر اساس متاآنالیز انجام شده در گیاه گندم، در ارقام مقاوم (۶۱۲۹۰/ ۲۳۹۴) ۴ ٪ از پروب‌ها، کاهش بیان و (۶۱۲۹۰/ ۲۶۷۰) ۴/۵ ٪ افزایش بیان داشته‌اند، همچنین در ارقام حساس (۶۱۲۹۰/ ۴۱۸۳) ۷ ٪ کاهش و (۶۱۲۹۰/ ۳۵۹۱) ۶٪ افزایش بیان داشته‌اند ($P\text{-value} \leq 0.05$). براساس نتایج بدست آمده از نمودار ونی که براساس پروب‌ایدی‌ها رسم گردید، در ارقام مقاوم به تنش خشکی گیاه گندم ۴۶۰ پروب ایدی کاهش بیان داشتند که در گروه‌های دیگر تکرار نشده بودند، ۶۵۸ پروب‌ایدی به طور اختصاصی در ارقام مقاوم، افزایش بیان داشته‌اند. در ارقام حساس هم به طور اختصاصی ۲۲۶۴ پروب‌ایدی کاهش و ۱۵۶۱ پروب‌ایدی افزایش بیان داشته‌اند (شکل ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲. نمودار ون بر اساس شناسه‌های نشانگر (پروب ایدی‌ها) با بیان متفاوت، حاصل از متاآنالیز

Figure 2. Venn chart based on differentially expressed probe ids, resulted of meta-analysis

بر اساس نتایج متاآنالیز، برخی از ژن‌ها تحت تنش خشکی، دارای رفتار بیانی مخالف در ارقام حساس و مقاوم بودند. کربوکسی‌پپتیداز D دارای افزایش بیان ۱/۶ در ارقام حساس و کاهش بیان ۲- برابری در ارقام مقاوم بوده‌است. همچنین ژن پروتئین باندینگ کلروفیل a-b نیز در ارقام حساس افزایش بیان و در ارقام مقاوم کاهش بیان نشان داد. ژن‌های فسفوانول پیروات کربوکسیلاز و putative calreticulin در ارقام مقاوم افزایش بیان و در ارقام حساس کاهش بیان نشان دادند (جدول ۲).

Calreticulin (CRT) یک پروتئین مهم چند منظوره می‌باشد که در بسیاری از سلولهای یوکاریوتی به جز مخمرها و گلبول‌های قرمز شناسایی شده‌اند (Xu et al. 2004). CRT در ابتدا به عنوان یک پروتئین مهم اتصال دهنده Ca^{2+} شناخته شده بود، اما تحقیقات نشان داده‌اند که CRT در بسیاری از عملکردهای سلولی مانند اتصال کلسیم، تاخوردگی صحیح گلیکوپروتئین‌ها، تعامل با گیرنده‌های سلولی، فعالیت اتصال RNA و در تعامل با پاسخ ایمنی نقش دارد (Nakhasi et al. 1998). فسفوانول پیروات کربوکسیلاز (PEPC) یک آنزیم سیتوزولی در گیاهان عالی است و همچنین در جلبک‌های سبز و باکتری‌ها به طور گسترده توزیع می‌شود (Sage et al. 2012). تا به امروز، چندین گونه C3 به صورت ژنتیکی برای تولید بیشتر PEPC اصلاح شده‌است (Miyao et al. 2011). مطالعات متعددی اثرات منفی افزایش فعالیت PEPC بر روی زیست‌توده را گزارش داده‌اند، برای مثال، تولید C4-pepc در برنج به دلیل افزایش تنفس در شرایط نوری منجر به کاهش میزان فتوسنتزی شده (Fukayama et al. 2003) و در نهایت رشد به شدت کاهش یافته‌است (Chen et al. 2004). مطالعات دیگر نشان داده‌اند که گیاهان تراریخته بیان کننده PEPC در شرایط تنش مانند اکسیداسیون نوری، گرما و خشکی دارای زیست‌توده نسبتاً

www.SID.ir

Archive of SID

زیادی بودند (Jiao et al. 2002; Jiao et al. 2005; Bandyopadhyay et al. 2007; Li-Feng et al. 2008; O'Leary et al. 2011; Lian et al. 2014). فسفوانول پیروات کربوکسیلاز C4 در بسیاری از گیاهان از جمله برنج (Ku et al. 1999) گندم (Han et al. 2013) و آرابیدوپسیس (Wang et al. 2012) کلون و شناسایی شده‌است. بیان ژن PEPC ذرت در گیاه برنج تراریخته باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدان تحت تنش خشکی شده‌است (Li-Feng et al. 2008). علاوه بر این، ده ژن PEPC در سویا مشخص شد، که بیان GmPEPC6، GmPEPC8 و GmPEPC9 به طور قابل توجهی در شرایط تنش شوری، خشکی و تنش سرما افزایش یافته‌اند (Zhang et al. 2019). نتایج به دست آمده در این تحقیق در ارتباط با افزایش بیان این ژن‌ها در ارقام مقاوم، با توجه به نقش آن‌ها در افزایش زیست‌توده در شرایط تنش و افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی که در مطالعات گذشته، گزارش شده، قابل توجیه می‌باشد، به طوری‌که با توجه به عملکرد این پروتئین‌ها در سلول، کاهش آن‌ها باعث ضعیف و حساس شدن گیاه در شرایط تنش، به خصوص تنش‌های طولانی مدت، می‌گردد. سی پروب‌ایدی از قبیل کربوکسی‌پپتیداز D و پروتئین باندینگ کلروفیل a-b افزایش بیان معنی‌داری را در ارقام حساس نشان دادند، اما در ارقام مقاوم بیان آنها کاهش یافته بود.

جدول ۲. برخی ژن‌های تغییر بیان یافته از نتایج متاآنالیز

Table 2. Some of the results of meta-analysis DEG genes expression

تغییربیان در ارقام حساس Expressed gene in sensitive varieties	تغییر بیان در ارقام مقاوم Expressed gene in tolerant varieties	سیمبل ژن Gene Symbol	نام ژن Gene name
---	1.83	LOC606341	ribosomal protein P1
-3.37	-2.73	*gstf6b*	glutathione transferase
-1.30	1.37	*Pepc*	phosphoenolpyruvate carboxylase
-2.06	---	LOC100415845	aci-reductone-dioxygenase-like protein
-1.2	1.46	CRT1	putative calreticulin
-1.91	----	hsp16.9-12LC2	heat shock protein 16.9

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir

Archive of SID

استروژن، آندروژن و PRL (prolactin) در یک مسیر مشابه، که مسیر کربوکسی‌پپتیداز آرژنین–نیتریک اکسید D (CPD-Arg-NO) می‌باشد، باعث بقای سلول می‌شود. CPD متالوپروتئیناز متصل به غشاء و فرآیندهای غشایی، مانده‌های آرژینین و لیزین ترمینال C را ترشح می‌کند. CPD بیشتر در شبکه ترنس گلژی برای پردازش پلی پپتیدها / پروهورمون‌هایی که مسیر ترشحی را ایجاد می‌کنند، فعالیت می‌کند (Thomas et al. 2017). CPD– غشای پلاسمایی روی سوبستراهای خارج سلولی عمل می‌کند، و آرژینین آزاد شده با CPD به سلول‌هایی منتقل می‌شود که سوبسترای مشترک دو آنزیم، آرژیناز و نیتریک اکسید سنتاز است. آرژیناز برای بیوسنتز پلی آمین، آرژینین را به اورنیتین تبدیل می‌کند. اکسید نیتریک اکسید سنتز آرژنین را به سیترولین و مونوکسید نیتروژن تبدیل می‌کند (Abdelmagid & Too 2008; Abdelmagid et al. 2011; Koirala et al. 2014). در مطالعه‌ای که روی کاهش بیان ژن CPD در آرابیدوپسیس جهش یافته صورت گرفته‌است، نقش آن در سنتز هورمون‌های استروئیدی و پاسخ به تنش‌ها و رشد سلول‌ها گزارش شده‌است، به طوریکه کاهش این ژن باعث فعال شدن یکسری ژن‌های تنظیم کننده تنش در نور می‌گردد (Salchert et al. 1998). در تحقیق حاضر افزایش بیان این ژن در ارقام حساس در شرایط تنش را می‌توان با این واقعیت در ارتباط دانست که در شرایط تنش گیاه برای ایجاد مقاومت نیاز به تنظیم بیان منفی این ژن و افزایش فعالیت ژن‌های پاسخ دهنده به تنش دارد و همانطور که نتایج نشان داده‌اند، در ارقام حساس، این ژن افزایش بیان نشان داده‌است. فتوسنتز که با استفاده از پروتئین‌های کلروفیل با جذب نور a / b (LHC) انجام می‌شود، برای رشد و نمو گیاه مهم می‌باشد. پروتئین‌های LHC از تیلاکوئیدها بسیار فراوان ایجاد شدند که توسط ژن‌های هسته ای رمزگذاری می‌شوند. در گیاهان عالی، پروتئین LHC شامل یک خانواده ژن بزرگ ۱۰–۱۲ عضو می‌باشد، گیرنده‌های نور محیطی از فتوسیستم I (PSI) و فتوسیستم II (PSII) تشکیل شده‌اند (Dekker & Boekema 2005; Daum et al. 2010). هر مارپیچ به مولکول‌های کلروفیل (کلروفیل a و b) و برخی کاروتنوئیدها در غشای تیلاکوئید متصل می‌شود. این نوع اتصال برای انتقال انرژی خورشیدی، جذب نور و محافظت از نور مورد نیاز است (Liu & Shen 2004; Neilson & Durnford 2010). در ارقام حساس این ژن افزایش بیان پیدا کرده‌است در حالیکه در ارقام مقاوم به دلیل واکنش دفاعی کاهش فتوسنتز، این ژن کاهش بیان پیدا کرده‌است. احتمالاً به علت کاهش میزان محتوای کلروفیل، واکنش به تنش خشکی تحت تأثیر قرار می‌گیرد و تفاوت ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم در تنش‌های شدید پدیدار می‌شود.از بین ژن‌هایی که در متاآنالیز تفاوت رفتار بیانی بین ارقام حساس و مقاوم نشان دادند، ژن *ARD* در ارقام حساس کاهش بیان معنی‌داری در شرایط تنش نسبت به حالت کنترل نشان داد، در حالیکه این ژن در ارقام مقاوم گندم افزایش یا کاهش بیان معنی در شرایط تنش نسبت به شرایط کنترل نشان نداده بود. این ژن برای بررسی های آزمایشگاهی کاندید شد.

شناسایی فاکتورهای رونویسی تغییر بیان یافته:عوامل رونویسی نقش مهمی را در تنظیم تمامی فرآیندهای زندگی یک گیاه ایفا می‌کند (Liu et al. 2012). در این مطالعه براساس اسم ژن‌های موجود نتایج متاآنالیز، ۴۰ فاکتور رونویسی

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی شد که تغییر بیان معنی‌داری را نشان دادند. در ارقام مقاوم و حساس، ۷ فاکتور رونویسی از جمله MADS-box TaAGL35, drought-responsive factor-like, DRFL1a zinc-finger افزایش بیان نشان دادند. ۴ فاکتور رونویسی که شامل bZIP TaAGL11، MADS-box، MIKC-type MADS-box، bZip type bZIP1 و WM19A در هر دو نوع ارقام حساس و مقاوم کاهش بیان داشته‌اند. در ارقام مقاوم فاکتورهای رونویسی Myb3، ethylene responsive 5a، MIKC-type MADS-box WM24B، salinity inducible ERF4 افزایش بیان و دو فاکتور رونویسی به نام‌های EREBP و NAC NAM کاهش بیان معنی‌داری را از خود نشان دادند. ۵ فاکتور رونویسی MYB، WRKY15، MADS-box TaAGL8، WRKY39 و Myb در ارقام حساس افزایش بیان و تنها یک فاکتور رونویسی به نام WRKY45 کاهش بیان معنی‌دار را از خود نشان دادند. فاکتورهای رونویسی (TF) شامل پروتئین‌هایی هستند که در تنظیم بیان ژن در سطح رونویسی نقش دارند (Fornes et al. 2020). این عوامل بر روی RNA پلیمراز تاثیر گذاشته و با مهار یا تحریک فعالیت آن موجب تنظیم بیان ژن می‌شوند.

تعداد عوامل رونویسی در موجودات مختلف متفاوت می‌باشد و این تعداد به اندازه‌ی ژنوم موجود وابسته می‌باشد، که هر چه اندازه ژنوم بزرگتر باشد، تعداد عوامل رونویسی بیشتری دارد (van Nimwegen 2006). عوامل رونویسی WRKY که نام این خانواده از چهار اسیدآمینه حفاظت شده آن (lysine-tyrosine- tryptophan-arginine) گرفته شده‌است. از بزرگترین خانواده‌های تنظیم کننده رونویسی در گیاهان هستند و به عنوان فعال‌کننده و مهارکننده در فرآیندهای مهم گیاهی شرکت می‌کنند (Rushton et al. 2010). این خانواده یکی از قدیمی‌ترین خانواده‌های ژنی فاکتورهای رونویسی می‌باشد که در تکامل سلسله گیاهی دچار مضاعف‌شدگی گسترده شده‌اند (Berri et al. 2009). این عوامل رونویسی تنظیم کننده‌هایی هستند که هم فعالیت‌های مثبت و هم منفی دارند (Eulgem & Somssich 2007). WRKY یکی از ده خانواده بزرگ ژنی است که در گیاهان عالی و تمام اجداد سبز گیاهی کشف شده‌است (Ülker & Somssich 2004). ژن‌های این خانواده در طی تکامل خود را با پیچیدگی‌های زیاد سازو کارهای دفاعی مقابله‌کننده با پاتوژن‌ها وفق داده‌اند (Eulgem et al. 2000). فاکتور رونویسی MADS-box نقش مهمی برای توسعه جانبی ریشه، تعیین نوع مریستم و مخصوصا تشکیل گلدهی ایفا می‌کنند (Causier et al. 2002). موتیف MADS-box ناحیه محافظت شده ۵۶ آمینواسیدی هستند که در دمین اتصالی DNA بسیاری از فاکتورهای رونویسی یوکاریوت مشاهده شده‌است. از برجسته‌ترین ویژگیهای خانوده ژنی MADS-box عملکرد متنوع اعضای آن است که جنبه های مختلف از رشد و توسعه گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. طبق مطالعات انجام شده خانواده ژنی از طریق مضاعف‌شدگی ژنها و مضاعف‌شدگی در سطح ژنوم کامل برنج ایجاد شده‌اند (Yang et al. 2012). در میان خانواده‌های مختلف عوامل رونویسی یوکاریوت، خانواده basic Leucine Zipper (bZIP) یکی از بزرگترین و متنوع‌ترین خانواده‌ها می‌باشد(Nijhawan et al. 2008; Wei et al. 2012). اعضا این خانواده در فرآیندهای مختلفی از جمله پاسخ به محرک‌های زیستی یا غیرزیستی، بلوغ بذر، جنین‌زایی، مسیرهای انتقال سیگنال در پاسخ به حمله پاتوژن‌ها، نمو گل و سیستم‌های

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir

Archive of SID

آوندی نقش دارند (Jakoby et al. 2002; Alves et al. 2013). این خانواده براساس ناحیه بازی لازم برای اتصال به DNA و ناحیه زیپ لوسین مورد نیاز برای دیمریزاسیون شناخته می‌شود (Liu et al. 2012). اعضا این خانواده تاکنون در گیاهان مختلفی از جمله آرابیدوسیس (Jakoby et al. 2002)، برنج (Nijhawan et al. 2008)، ذرت (Wei et al. 2012)، انگور (Liu et al. 2014) و جو (Pourabed et al. 2015) مورد بررسی قرار گرفته‌است.

تایید آزمایشگاهی بیان ژن شناسایی شده: جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد اثر اصلی ژنوتیپ و خشکی و همچنین اثر متقابل خشکی و ژنوتیپ بر روی بیان ژن ARD در سطح احتمال ۱ درصد ($P\leq0.01$) معنی‌دار می‌باشند (جدول ۳). معنی‌دار بودن اثرات اصلی به این معنی می‌باشد که دو ژنوتیپ Sundor و 6o4 به احتمال ۹۹٪ با هم متفاوت می‌باشند و معنی‌داری سطوح مختلف خشکی نشان دهنده‌ی متفاوت بودن اثرات تنش خشکی در ۲، ۴ و ۷ روز بر روی گیاه گندم می‌باشد. در رقم 6o4 که رقمی مقاوم به تنش خشکی می‌باشد میزان بیان ژن ARD در تنش ۲ روز (ضعیف)، ۴ روز (متوسط) و ۷ روز (شدید) در مقایسه با حالت کنترل دارای افزایش بیان بوده‌است اما این افزایش بیان نسبت به شرایط کنترل در این رقم معنی دار نبوده است و در مقایسه میانگین، به همه سطوح تنش در این رقم حرف یکسان تعلق گرفته‌است. در رقم Sundor که رقمی حساس به تنش خشکی می‌باشد در هر سه سطح نسبت به کنترل کاهش بیان داشته‌است (شکل ۳)، که بیشترین کاهش بیان در زمان ۴ روز پس از تنش به میزان ۵. ۴- بوده‌است و در زمان‌های ۲ روز و ۷ روز پس از تنش نیز کاهش بیان نسبت به شرایط کنترل معنی دار بوده‌است. . در بین نتایج متاآنالیز انجام شده در این پژوهش کاهش بیان ژن ARD در ارقام حساس گزارش شده‌است که نتایج به دست آمده از Real time PCR ، همسو با نتایج متاآنالیز انجام شده می‌باشد و نتیجه‌ی بدست آمده از متاآنالیز را تایید می‌کند. خانواده ARD مشترک بین باکتری‌ها، گیاهان و حیوانات می‌باشد که در مسیر نجات متیونین درگیر هستند (Lin et al. 2005). ARD بسته به یون فلزی که به عنوان کوفاکتور به آن وصل شده‌است، با دو فعالیت آنزیمی متفاوت می‌باشد (Xu et al. 2010). اگر آهن (Fe^{2+}) محدود باشد، ARD مرحله پیش فرض موجود در مسیر نجات متیونین (MSP) را کاتالیز می‌کند، و به صورت اکسیداتیو پیش ساز کتواسید متیونین، ۲- کتو-۴- (متیلتیو) اسید بوتیریک را تولید می‌کند. اما اگر نیکل (Ni^{2+}) محدود باشد، یک محصول خارج از مسیر، مونوکسید کربن، به همراه اسید ۳-متیل تیوپروپیونیک تولید می‌شود (Deshpande et al. 2017). مسیرهای مختلف مقاومت در برابر بیماری و پاسخ به استرس ممکن است سطح رونوشت‌های TaARD را تنظیم کند. TaARD ممکن است در مسیر سنتز اتیلن شرکت کند و از سیگنال‌های اتیلن در پاسخ به تنش های زنده و غیر زنده استفاده کند. بنابراین، توصیف بیشتر عملکرد TaARD در مسیر سنتز اتیلن و مسیر سیگنالینگ اتیلن مهم خواهدبود (Xu et al. 2010). در سیب‌زمینی، بیان StARD، همراه با محتوای PAs ، در سطح زخمی غده‌های سیب‌زمینی افزایش یافته‌است، نشان می‌دهد که ARD و PA ممکن است نقش مهمی در استرس غیر زنده داشته‌باشند (Kim et al. 2008). با این حال در گندم نقش ARD در پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده مشخص نشده‌است (Xu et al. 2010). ژن‌های

www.SID.ir

Archive of SID

ARD در تعداد زیادی از گیاهان مانند برنج دو ژن ARD، در آرابیدوپسیس چهار ژن و در سیب زمینی سه ژن ARD شناسای شده‌است. ژن‌های ARD به تعداد نسبتاً بالایی در گیاهان وجود دارد که نشان می‌دهد این ژن ها به طور تکاملی حفظ می‌شوند و احتمالاً عملکردهای مهمی در گیاهان دارند (Sauter et al. 2005; Bürstenbinder et al. 2007; Kim et al. 2008).

جدول ۳. تجزیه واریانس تغییرات بیان ژن ARD در ژنوتیپ‌های گندم طی زمان‌های مختلف پس از اعمال تنش خشکی

Table 3. Analysis of variance for ARD gene in wheat genotypes at different times after applying drought stress

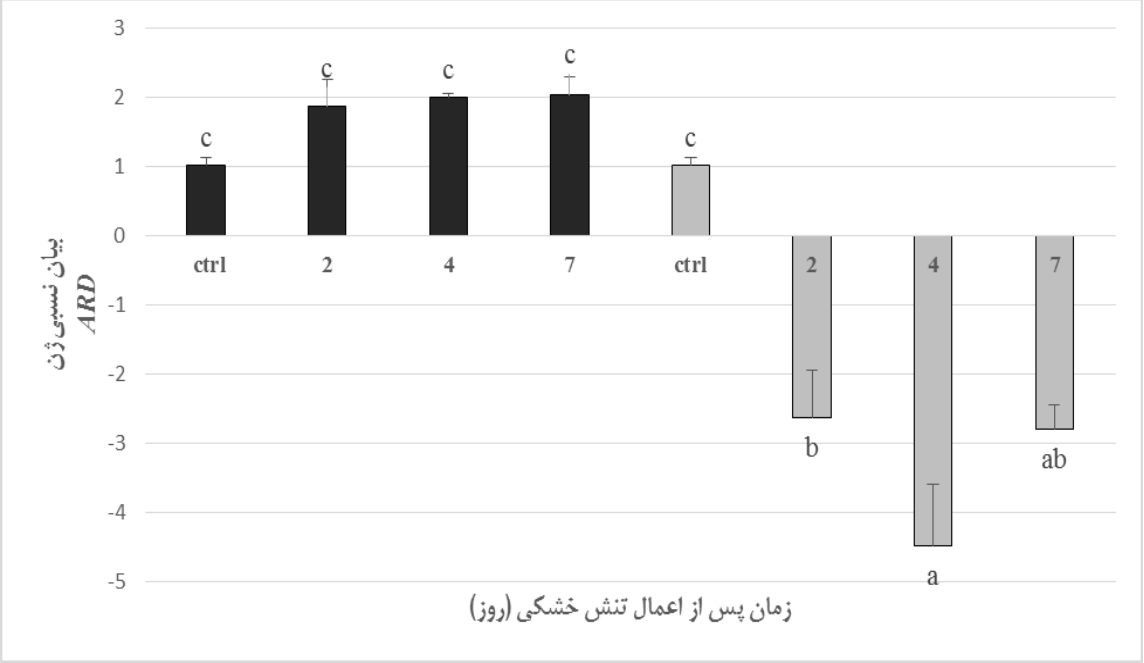
منابع تغییر Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean Square	Sig.
ژنوتیپ Genotype	1	125.500	0.000**
خشکی Drought	3	6.994	0.001**
تکرار Repeat	3	0.528	0.605ns
ژنوتیپ * خشکی Genotype * Drought	3	15.416	0.000**
اشتباه آزمایشی Experimental error	21	0.842	

ns و ** به ترتیب غیرمعنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد .

نتیجه‌گیری: به دلیل تغییر اوضاع جوی، اثرات گلخانه‌ایی و کمبود منابع موجود و همچنن خشکسالی‌های پی در پی تحقیقات لازم در ارتباط با گیاهان مقاوم در برابر این تغییرات ضرورت دارد. در این پژوهش از کتابخانه‌های حاوی داده‌های ریزآرایه گیاه گندم برای تعدادی از ارقام حساس و متحمل به خشکی استفاده گردید. شناسایی این ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی می‌توانند در فهم مکانیسم های مقاومت و ایجاد گیاهان مقاوم در برابر تنش خشکی مؤثر باشند. از جمله فاکتورهای رونویسی شناسایی شده می‌توان WRKY، MADS-box و bZIP را نام برد. براساس نتایج متاآنالیز و همچنین Real time PCR انجام شده *ARD* بعنوان ژنی موثر در تنش خشکی شناخته شد که دارای رفتار بیانی متفاوت در بین ارقام مقاوم و حساس گندم می‌باشد. با توجه به بررسی رفتار بیانی این ژن و دیگر نتایج بدست آمده از این مطالعه متاآنالیز، می‌توان گامی موثر در پیش‌بینی مقاومت و حساسیت به خشکی در ارقام مختلف گندم برداشت.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. میزان تغییر بیان ژن *ARD* در ژنوتیپ گندم متحمل به خشکی (6O4) و ژنوتیپ گندم حساس به خشکی (Sundor) در سه سطح تنش ۲، ٤ و ۷ روز بعد از اعمال تنش خشکی

Figure 3. DEG Expression of *ARD* gene in tolerant wheat (6O4) and Sensitive wheat (Sundor) genotypes at three stress levels 2, 4 and 7 days after drought stress

منابع

خضری غفار؛ شبر زهرا سادات؛ ناجی امیرمحمد (۲۰۱۵) بررسی بیوانفورماتیکی ژن‌های خانواده‌ی عوامل رونویسی WRKY در گندم. دوفصلنامه فن آوری زیستی در کشاورزی ۶ ، ۳۹-۴۴.

وفابخش جواد؛ نصیری محلاتی مهدی؛ کوچکی علیرضا و عزیزی مهدی (۲۰۰۹) اثر تنش خشکی بر کارآیی مصرف آب و عملکرد ارقام کلزا. پژوهشهای زراعی ایران ۱، ۲۹۲ – ۲۸۵.

References

Abdelmagid SA, Rickard WJ, McDonald LN, Thomas CK (2011) CAT-1-mediated arginine uptake and regulation of nitric oxide synthases for the survival of human breast cancer cell lines. J Cell Biochem 112, 1084-1092.

Abdelmagid SA, Too CK (2008) Prolactin and estrogen up-regulate carboxypeptidase-d to promote nitric oxide production and survival of mcf-7 breast cancer cells. J Endocrinol 149, 4821-4828.

Alves MS, Dadalto SP, Gonçalves Ab et al. (2013) Plant bZIP transcription factors responsive to pathogens: a review. Int J mol sci 14, 7815-7828.

www.SID.ir

Archive of SID

Bandyopadhyay A, Datta K, Zhang J et al. (2007) Enhanced photosynthesis rate in genetically engineered indica rice expressing pepc gene cloned from maize. Plant Sci 172, 1204-1209.

Berri S, Abbruscato P, Faivre-Rampant O et al. (2009) Characterization of WRKY co-regulatory networks in rice and Arabidopsis. BMC plant Biol 9, 120.

Budak H, Kantar M, Yucebilgili Kurtoglu K (2013) Drought tolerance in modern and wild wheat. Sci World J, e2013.

Bürstenbinder K, Rzewuski G, Wirtz M et al. (2007) The role of methionine recycling for ethylene synthesis in Arabidopsis. Plant J 49, 238-249.

Causier B, Kieffer M, Davies B (2002) MADS-box genes reach maturity. Sci 296(5566), 275-276.

Chen LM, Li KZ, Miwa T, Izui K (2004) Overexpression of a cyanobacterial phosphoenolpyruvate carboxylase with diminished sensitivity to feedback inhibition in Arabidopsis changes amino acid metabolism. Planta 219, 440-449.

Chopra RK, Shukla S, Singh K et al. (2013) Characterization of high yielding and drought tolerant RILs identified from wheat cross WL711 x C306 RIL mapping population using Drought Susceptibility Index (DSI) as selection criteria. Ind J. Plant Genet. Res 26, 25-31.

Daum B, Nicastro D, Austin J et al. (2010) Arrangement of photosystem II and ATP synthase in chloroplast membranes of spinach and pea. Plant Cell 22, 1299-1312.

Dekker JP, Boekema EJ (2005) supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. Biochim Biophys Acta Biomembr 1706,12-39.

Delmer DP (2005) Agriculture in the developing world: connecting innovations in plant research to downstream applications. Proc Natl Acad Type J 102, 15739-15746.

Deshpande AR, Pochapsky TC, Ringe D (2017) the metal drives the chemistry: dual functions of acireductone dioxygenase. Chem Rev 117, 10474-10501.

Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. Tren plant sci,5, 199-206.

Eulgem T, Somssich IE (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. Curr Opin Plant Biol 10, 366-371.

Fornes O, Castro-Mondragon JA, Khan A et al. (2020) JASPAR 2020: update of the open-access database of transcription factor binding profiles. Nucleic Acids Res Spec Publ 48, D87-D92.

www.SID.ir

Archive of SID

Fukayama H, Hatch MD, Tamai T et al.(2003) Activity regulation and physiological impacts of maize C 4-specific phosphoenolpyruvate carboxylase overproduced in transgenic rice plants. Photosynth Res 77, 227-239.

Glass GV (1976) Primary, secondary, and meta-analysis of research. J Educ Res 5, 3-8.

Han L, Xu W, Hu L et al. (2013) Preliminary study on the physiological characteristics of transgenic wheat with maize C4-pepc gene in field conditions. Cereal Res Commun 42, 70-80.

Harinder V, Jyoti S, Amolkumar S, Jasdeep P (2019) Isolation and Characterization of Stress Inducible Protein (TaSti/Hop) from Heat-Tolerant Wheat Cultivar C306. Res J Biotechnol 14, 6.

Hong F, Breitling R, McEntee CW et al. (2006) RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. J Bioinform 22, 2825-2827.

Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W et al.(2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. Trends plant sci 7, 106-111.

Jha UC, Bohra A, Singh NP (2014) Heat stress in crop plants: its nature, impacts and integrated breeding strategies to improve heat tolerance. Plant Bree 133, 679-701.

Jiao D, Huang X, Li X et al. (2002) Photosynthetic characteristics and tolerance to photo-oxidation of transgenic rice expressing C 4 photosynthesis enzymes. Photosynth Res 72, 85-93.

Jiao D, Li X, Ji B (2005) Photoprotective effects of high-level expression of C 4 phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice during photoinhibition. Photosynth 43, 501-508.

Khezri GH, Shabr ZS, Naji AM (2015) Bioinformatics study of genes of WRKY transcription factor family in wheat. Bi-Quarterly J Biotechnol Agric 6 , 39-44 (In Persian).

Kim H, Zhou J, Kumar D et al. (2020) SHORTROOT-mediated intercellular signals coordinate phloem development in arabidopsis roots. Plant Cell 32,1519–1535.

Kim JH, Kim HS, Lee YH et al. (2008) Polyamine biosynthesis regulated by StARD expression plays an important role in potato wound periderm formation. Plant cell physiol 49, 1627-1632.

Kinoshita K, Obayashi T (2009) Multi-dimensional correlations for gene co-expression and application to the large-scale data of Arabidopsis. J Bioinform 25, 2677-2684.

Koirala S, Thomas LN, Too CK (2014) Prolactin/Stat5 and androgen R1881 coactivate carboxypeptidase-D gene in breast cancer cells. Mol Endocrinol 28, 331-343.

Krugman T, Chagué V, Peleg Z et al.(2008) Differential gene expression in wild emmer wheat genotypes contrasting in drought resistance.

www.SID.ir

Archive of SID

Ku MS, Agarie S, Nomura M et al. (1999) High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. Nat biotechnol 17, 76.

Lian L, Wang X, Zhu Y et al. (2014) Physiological and photosynthetic characteristics of indica Hang2 expressing the sugarcane PEPC gene. Mol biol rep 41, 2189-2197.

Li-Feng F, Zai-Song D, Ming Z (2008) Characteristics of drought tolerance in ppc overexpressed rice seedlings. Acta Agronomica Sinica ,e18.

Lin T, He X, Yang L et al. (2005) Identification and characterization of a novel water-deficit-suppressed gene OsARD encoding an aci-reductone-dioxygenase-like protein in rice. Gene 360, 27-34.

Lipsey MW, Wilson DB (2001) Practical meta-analysis, Sage Publications, Inc.

Liu C, Wu Y, Wang X (2012) bZIP transcription factor OsbZIP52/RISBZ5: a potential negative regulator of cold and drought stress response in rice. Planta 235, 1157-1169.

Liu J, Chen N, Chen F et al. (2014) Genome-wide analysis and expression profile of the bZIP transcription factor gene family in grapevine (Vitis vinifera). BMC genom 15, 281.

Liu XD, Shen YG (2004) NaCl-induced phosphorylation of light harvesting chlorophyll a/b proteins in thylakoid membranes from the halotolerant green alga, Dunaliella salina. FEBS Lett 569, 337-340.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. methods 25,402-408.

Marti J, Slafer GA (2014) Bread and durum wheat yields under a wide range of environmental conditions. Field Crop Res 156: 258-271.

Miyao M, Masumoto C, Miyazawa SI, Fukayama H (2011) Lessons from engineering a single-cell C4 photosynthetic pathway into rice. J Exp Bot 62, 3021-3029.

Mohammadi-Dehcheshmeh M, Niazi A, Ebrahimi M et al. (2018) Unified transcriptomic signature of Arbuscular mycorrhiza colonization in roots of Medicago truncatula by integration of machine learning, promoter analysis and direct merging meta-analysis. Front Plant Sci 9, 1550.

Nakhasi H, Pogue GP, Duncan R et al. (1998) Implications of calreticulin function in parasite biology. J Parasitol 14, 157-160.

Neilson JA, Durnford DG (2010) Structural and functional diversification of the light-harvesting complexes in photosynthetic eukaryotes. Photosynth res 106, 57-71.

Nijhawan A, Jain M, Tyagi AK, Khurana JP (2008) Genomic survey and gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in rice. Plant physiol 146, 333-350.

www.SID.ir

Archive of SID

O'Leary B, Park J, Plaxton WC (2011) the remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. Biochem J 436, 15-34.

Pourabed E, Golmohamadi FG, Monfared PS et al. (2015) Basic leucine zipper family in barley: genome-wide characterization of members and expression analysis. Mol biotechnol 57, 12-26.

Rajala A, Hakala K, Mäkelä P et al. (2009) Spring wheat response to timing of water deficit through sink and grain filling capacity. Field Crop Res 114, 263-271.

Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ (2010) WRKY transcription factors. Trends in plant sci 15, 247-258.

Sage RF, Sage TL, Kocacinar F (2012) Photorespiration and the evolution of C4 photosynthesis. Annu Rev Plant Biol 63,19-47.

Sauter M, Lorbiecke R, OuYang B et al. (2005) The immediate-early ethylene response gene OsARD1 encodes an acireductone dioxygenase involved in recycling of the ethylene precursor S-adenosylmethionine. Plant J 44, 718-729.

Shaar-Moshe L, Hübner S, Peleg Z (2015) Identification of conserved drought-adaptive genes using a cross-species meta-analysis approach. BMC plant biolo 15, 111.

Takeda S, Matsuoka M (2008) Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. Nat Rev Genet 9, 444.

Thomas LN, Chedrawe ER, Barnes PJ , Too CK (2017) Prolactin/androgen-inducible carboxypeptidase-D increases with nitrotyrosine and Ki67 for breast cancer progression in vivo, and upregulates progression markers VEGF-C and Runx2 in vitro. Breast Cancer Res Treat 164, 27-40.

Ülker B, Somssich IE (2004) WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. Curr Opin Plant Biol 7, 491-498.

Vafabakhsh J, Nasirimahallati M, Kochaki AR, Azizi M (2009) Effect of drought stress on water use efficiency and yield of rapeseed cultivars. Iran Agric Res 1, 292 – 285 (In Persian).

Van Nimwegen E (2006) Scaling laws in the functional content of genomes. Power Laws, Scale-Free Networks and Genome Biology. Springer Sci Rev 236-253.

Wang YM, Xu WG, Hu L et al. (2012) Expression of maize gene encoding C 4-pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) and C 4-phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) in transgenic Arabidopsis. Plant mol biol rep 30, 1367-1374.

Wei K, Chen J, Wang Y et al. (2012) Genome-wide analysis of bZIP-encoding genes in maize. DNA res 19, 463-476.

www.SID.ir

Archive of SID

Xu G, Fang QQ, Keirans JE, Durden LA (2004) Cloning and sequencing of putative calreticulin complementary DNAs from four hard tick species. J parasitol 73-78.

Xu L, Jia J, Lv J et al. (2010) Characterization of the expression profile of a wheat aci-reductone-dioxygenase-like gene in response to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. Plant Physiol Biochem 48, 461-468.

Yang Y, He M, Zhu Z et al. (2012) Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. BMC Plant Biol 12, 140.

Zhang N, Zhou S, Yang D, Fan Z (2020) Revealing shared and distinct genes responding to JA and SA signaling in arabidopsis by meta-analysis. Front Plant Sci 11, 908.

Zhang X, Pu P, Tang Y et al. (2019) C4 photosynthetic enzymes play a key role in wheat spike bracts primary carbon metabolism response under water deficit. Plant Physiol Biochem 142,163-172.

www.SID.ir