ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۷
صفحه ۳۹۱ - ۳۸۱

آشکارسازی مسیرهای مشترک ترارسانی جاسمونیک‌اسید و سرما به‌وسیله شبکه هم‌بیان ژنی وزن‌دار

Common signalling pathways of jasmonic acid and cold revealed by weighted gene coexpression network analysis

مریم مرتضایی‌فر[۱]، رضا فتوت*[۱]، فرید شکاری[۱]، شهریار ساسانی[۲]

۱- دانشجوی دکتری، استادیار، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۲- استادیار، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، کرمانشاه، ایران

Mortezaeefar M[1], Fotovat R[*1], Shekari F[1], Sasani Sh[2]

1- PhD Student, Assistant Professor, Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
2- Assistant Professor, Crop and Horticultural Sciences Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Kermanshah, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: r_fotovat@znu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

چکیده

گیاهان برای مقاومت به تنش سرما از راه‌کارهای مختلفی در سطوح ملکولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک استفاده می‌کنند. فیتوهورمون‌های مانند جاسمونیک‌اسید در پاسخ گیاهان به تنش نقش مهمی دارند. مطالعات کمی در مورد اثر این هورمون بر تنش سرما وجود دارد و هنوز مسیرهای ترارسانی آن در پاسخ گیاه به دماهای پایین ناشناخته است. در این مطالعه، یک شبکه هم بیان ژنی وزن‌دار برای تعیین تأثیر جاسمونیک‌اسید بر پاسخ‌های آرابیدوپسیس به سرما با استفاده از داده‌های ریزآرایه به‌کار برده شد. تجزیه و تحلیل شبکه منجر به تشکیل ۱۵ گروه ژنی شد که هر کدام فرآیند خاصی را کنترل می‌کرد. نتایج نشان داد فتوسنتز و فرآیندهای سوخت و ساز کربوهیدرات‌ها از مهم‌ترین فرآیندهای مسیر زیستی در پاسخ به جاسمونیک‌اسید و سرما هستند. شبکه هم‌بیان ژنی نقش مهم عامل‌های رونویسی را در کنترل این فرآیندها آشکار کرد. بر اساس نتایج به‌دست آمده دو عامل رونویسی ERF13 و ORA47 برای ارتباط میان جاسمونیک‌اسید و تحمل به سرما به‌عنوان کاندیدا انتخاب شدند که حدواسطی میان عامل‌های رونویسی CBF1 و CBF2 و پروتئین‌های تنظیم‌کننده در مسیر ترارسانی جاسمونیک‌اسید از خانواده tify هستند. همکاری سه عامل رونویسی HY5، bHLH15 و PIF3 نیز در این مسیر ترارسانی با یکدیگر منجر به پاسخ مناسب گیاه به دماهای پایین می‌شود.

واژه‌های کلیدی

شبکه هم بیانی وزن‌دار
خوگیری به سرما
زیست‌شناسی سامانه‌ای
عامل‌های رونویسی
فتوسنتز
هسته‌شناسی ژنی

مقدمه

دماهای پایین رشد، نمو و عملکرد محصولات را تحت تأثیر قرار می‌دهد. برخی از گونه‌های گیاهی تنش‌های سرما را در فرآیند خوگیری به سرما[1] تحمل می‌کنند (Nakamura et al. 2008). خوگیری به سرما فرآیندی است که گیاهان پس از قرار گرفتن در دماهای پایین غیر انجماد، قادر به تحمل دماهای انجماد هستند. از سوی دیگر، گیاهان پاییزه، مانند آرابیدوپسیس، گندم، جو، چاودار و جودوسر، برای وارد شدن به فاز گلدهی نیاز به دوره‌ای از دماهای پایین را دارند که به این فرآیند بهاره‌ساری گفته می‌شود (Kim et al. 2009).

گیاهان برای خوگیری به تنش سرما از مکانیسم‌های مختلفی در سطوح ملکولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک استفاده می‌کند و از این طریق قادر هستند تا تحت شرایط نامساعد محیطی زنده بمانند. تعدادی از این مکانیسم‌ها به‌واسطه فعالیت برخی از تنظیم کننده‌های رشد و فیتوهورمون‌های پاسخ‌دهنده به تنش بوده، که شامل آبسزیک اسید (ABA)، اتیلن، سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید (JA) می‌باشد (Kolaksazov et al. 2013). مسیر ترارسانی JA نقش مهمی در بروز پاسخ‌های دفاعی گیاهان به تنش‌های زیستی و غیر زیستی ایفا می‌کند. JA و مشتقات آن نظیر متیل جاسمونات فرآورده‌های نهایی مسیر اکتادکانوئید[2] هستند که پس از طی مراحل مختلف ناشی از عملکرد آنزیم‌های متعدد بر روی اسیدهای چرب غیراشباع موجود در کلروپلاست سلول‌های گیاهی و اکسیداسیون آن‌ها تولید می‌شوند (Turner et al. 2002). بیان ژن‌های سنتز کننده Allene Oxid Synthase JA، و محتوای JA در سرما افزایش می‌یابد. از سوی دیگر، تیمارهای سرما موجب افزایش تحمل گندم زمستانه به پاتوژن‌های مختلف می‌شود و مشخص شده‌است که مسیر اتیلن/ جاسمونیک‌اسید برای ایجاد مقاومت به بیماری القا شده توسط سرما نقش دارد (Gaudet et al. 2011). علاوه‌براین، تنش سرما تعدادی از ژن‌های مسیر ترارسانی و بیوسنتز هورمون‌های ABA و JA را فعال می‌کند و در نهایت موجب تجمع ABA و JA می‌شود. هورمون JA همچنین تحمل به سرما را از طریق تنظیم آبشار ICE-CBF/DREB1 افزایش می‌دهد، در حالی که ترکیبات درگیر در بیوسنتز و ترارسانی ABA برای بیان ژن‌های *COR*[3] در پاسخ به سرما ضروری می‌باشند (Yanru Hu et al. 2013). هورمون JA به‌عنوان جایگزینی برای ABA در طی تنش سرما برای سرکوب رشد معرفی شده‌است زیرا JA مانع رشد و تقسیم سلولی می‌شود (Kosová et al. 2012). با توجه به نقش مهم هورمون JA در تنش‌های گوناگون مطالعات کمی در مورد اثر این هورمون بر تنش سرما وجود دارد و هنوز مسیرهای ترارسانی آن در پاسخ به دماهای پایین ناشناخته است.

روش‌های تجزیه و تحلیل شبکه در بیان ارتباط میان ژن‌ها و صفت‌های پیچیده کاربرد دارد. روش‌های متنوعی برای تعیین ارتباطات ژنی از داده‌های بیانی در ناحیه پژوهش‌های زیست شناسی سامانه‌ای وجود دارد (Dong and Horvath 2007). روش تجزیه وتحلیل شبکه هم‌بیانی وزن‌دار (WGCNA)[4] گروه‌های ژنی (ماژول) را از داده‌های بیانی ایجاد می‌کند (Dong and Horvath 2007). هر ماژول گروهی از ژن‌ها است که پروفایل بیانی آن‌ها، در میان نمونه‌های مختلف، به شدت با یکدیگر همبستگی دارند (Bergmann et al. 2004). در روش WGCNA ماژول‌های ژنی از طریق خوشه‌بندی سلسله مراتبی بر روی همبستگی‌های به‌دست‌آمده میان جفت ژن‌ها تعیین می‌شوند (Langfelder and Horvath 2008). هر ماژول هم‌بیان با مسیرهای زیستی حقیقی در ارتباط می‌تواند باشد که برای بررسی معنی‌داری این مسیرها در هر ماژول از نظر بیولوژیکی از تجزیه و تحلیل هسته‌شناسی ژن (Gene Ontology (GO)) استفاده می‌شود (Langfelder and Horvath 2008). در این شبکه، ژن‌ها در صورتی با هم در ارتباط هستند که پروفایل بیانی آن‌ها با تغییر شرایط محیطی به‌صورت هم‌زمان تغییر کند. از مزیت‌های مهم این روش آن است که از مجموعه‌های ژنی از پیش تعیین شده استفاده نمی‌کند و فقط از داده‌های بیانی استفاده می‌کند (Zhang and Horvath 2005). در این مطالعه از شبکه هم‌بیان ژنی وزن‌دار برای تجزیه داده‌های ریزآرایه سرما و JA در گیاه آرابیدوپسیس استفاده شد. با استفاده از این روش می‌توان به دیدگاه جامعی در ارتباط

[1] Cold acclimation
[2] Octadecanoid pathway
[3] *cold-regulated (cor)* genes
[4] Weighted gene co-expression network

با مسیرهای زیستی از نقش JA در کنترل پاسخ‌های گیاه به دماهای پایین دست یافت. علاوه بر این، به کمک این روش و تجزیه و تحلیل‌های بعدی آن می‌توان به ژن‌های کلیدی از جمله عامل‌های رونویسی دست یافت که کنترل‌کننده سیستم در پاسخ گیاهان به سرما و JA است. هم‌چنین برای برخی از ژن‌ها می‌توان عملکردهای جدیدی را تعریف کرد که پیش‌تر به آن توجهی نشده‌است.

مواد و روش‌ها

داده‌های خام ریزآرایه (۳۹ داده برای سرما و ۹۱ داده برای JA) از پایگاه داده ریزآرایه GEO[1] (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term) به‌دست آمد (جدول۱). داده‌های بیانی خام توسط الگوریتم RMA[2] و با استفاده از نرم‌افزار Affymetrix expression console نرمال شدند. تعداد کل ژن‌ها ۲۲۸۱۰ ژن بود که بر اساس واریانس به‌دست آمده برای هر ژن در شرایط مختلف به ۱۰۵۶۲ ژن کاهش یافت تا ژن‌هایی با عدم تغییرات بیانی حذف شوند. برای انجام آنالیز شبکه از نرم‌افزار R و بسته نرم‌افزاری WGCNA استفاده شد تا شبکه هم‌بیان ژنی وزن‌دار ساخته شود (Zhang and Horvath 2005; Langfelder and Horvath 2008).

جدول ۱- داده‌های ریزآرایه استفاده شده در تجزیه و تحلیل هم‌بیانی برهمکنش میان JA و سرما برای گیاه آرابیدوپسیس

Accession	Sample Number	Reference
Jasmonic acid Data		
GSE10732	18	(Mueller et al. 2008)
GSE18667	12	(Lozano-Durán et al. 2012)
GSE21762	12	--
GSE35700	12	(Cerrudo et al. 2012)
GSE4733	27	(Mandaokar et al. 2006)
GSE45662	10	(Po Hu et al. 2013)
Cold Data		
GSE55907	6	--
GSE63184	12	(Chan et al. 2016)
GSE3326	16	(Lee et al. 2005)
GSE19254	8	--
GSE64575	9	--

[1] Gene Expression Omnibus
[2] Robust Multi-array Average

در ابتدا همبستگی پیرسون میان همه جفت ژن‌ها محاسبه شد تا ماتریس همبستگی به‌دست آید. اعداد به‌دست آمده به توان β رسید که یکی از مهم‌ترین پارامترها برای ایجاد شبکه وزن‌دار β می‌باشد. در اینجا با $R2 \geq 80\%$ بهینه شد تا خصوصیت scale free topology برای شبکه حفظ شود، به این معنا که تعدادی از ژن‌ها دارای ارتباط بیش‌تر و تعدادی ژن‌ها دارای ارتباط ضعیف‌تر می‌باشند. هم‌چنین تعداد اتصال میان گره‌ها به اندازه کافی باشد. ماتریس مجاورتی به‌دست آمده بیانگر ارتباطات میان ژن‌ها است و ارتباط میان آن‌ها از طریق مقادیر topology overlap (TO) تعیین می‌شود که میان صفر و یک می‌باشد و هر چه به یک نزدیک‌تر باشد بیانگر ارتباط نزدیک‌تر میان آن‌ها می‌باشد. ماتریس مجاورتی یا همان TO به ماتریس فاصله تبدیل شده و در نهایت از این ماتریس برای ترسیم درخت خوشه‌بندی سلسله مراتبی استفاده شد. گروه‌های ژنی بر اساس روش dynamic tree cut گروه‌بندی شدند و از این طریق گروه‌های ژنی (ماژول‌ها) تعیین شدند (Zhang and Horvath 2005). از نرم‌افزار Cytoscape 2.8.3 برای ترسیم و ایجاد شبکه‌ها برای ۲۰۰ همبند برتر هر ماژول در واکنش به JA و سرما (بر اساس TOM) استفاده شد (Smoot et al. 2011). علاوه‌براین، از شبکه‌های string (http://string-db.org) برای شناسائی و ترسیم شبکه ژن‌های مدنظر، برای نشان دادن ارتباط میان ژن‌ها، استفاده شد (Szklarczyk et al. 2014).

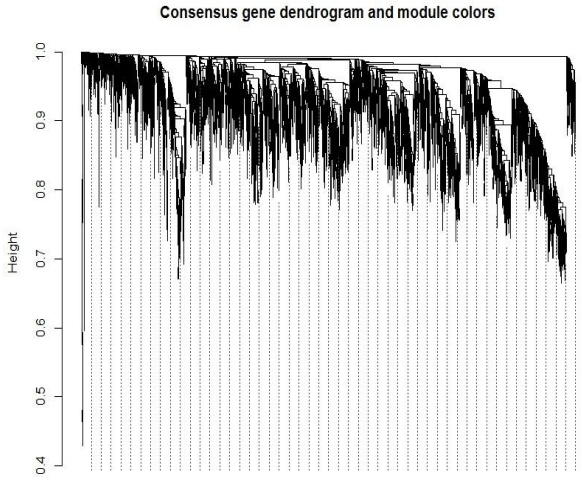
تجزیه و تحلیل GO برای هر ماژول از Fisher's exact test و روش Yekutieli برای کنترل FDR با $p\text{-value} < 0.001$ توسط نرم‌افزار آنلاین agriGO (http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO) انجام شد (Du et al. 2010). علاوه‌براین، تجزیه و تحلیل Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) برای مجموعه‌های ژنی KEGG، خانواده‌های ژنی و اهداف microRNA و عامل‌های رونویسی با استفاده از ابزار PlantGSEA واقع در سایت http://structuralbiology.cau.edu.cn/PlantGSEA/index.php انجام شد. این تجزیه و تحلیل‌ها تعیین می‌کند که آیا مجموعه‌های ژنی از پیش تعیین شده برای ژن‌های پاسخ‌گو به وضعیت‌های بیولوژیکی خاص معنی‌دار هستند (Yi et al. 2013). تست معنی‌داری آن با استفاده از Fisher's exact test انجام شد. برای

یافتن نرخ خطای نوع دوم از روش Yekutieli با سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد. ۱۰۰۰ جفت‌باز از نواحی تنظیمی بالادست توالی‌های پیشبر گروه‌های ژنی مد نظر از سایت plant ensemble genome (https://plants.ensembl.org/biomart/martview) به‌دست آمد و برای بررسی خصوصیات پیشبرها این ژن‌ها از سایت AtPAN (http://atpan.itps.ncku.edu.tw/index.php?id=gene_group) با سطح اطمینان بزرگ‌تر از ۹۰ درصد استفاده شد تا عناصر مشترک پاسخ دهنده به عامل‌های رونویسی در آن‌ها تعیین شوند (Chen et al. 2012).

نتایج و بحث

در ابتدا داده‌ها نرمال شده و سپس به‌منظور کاهش حجم محاسبات از داده‌های اولیه ۱۰۵۶۲ ژن با واریانس میان نمونه‌های مختلف بیش‌تر از ۰/٤٥ انتخاب و آنالیز شبکه بر روی این داده‌ها انجام شد. میزان β بر اساس نمودار ترسیم شده هشت انتخاب شد. روش خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی شبکه هم‌بیانی ژن‌ها را درون ۱۵ گروه مجزا (ماژول) قرار داد (شکل ۱) که به‌منظور تفکیک بهتر هر ماژول با رنگ خاصی نشانه‌گذاری شد. ماژول‌ها از نظر تعداد عضو متفاوت بودند به گونه‌ای که ماژول فیروزه‌ای (turquoise) دارای بیش‌ترین تعداد ژن (۲٦٦۰) و برنزه‌ای (cyan) دارای کم‌ترین تعداد ژن (۳٤) بودند. آنالیز GO نشان داد که همه ماژول‌ها دارای گروه‌های کارکردی معنی‌دار بوده و اعمال مختلف سلول به‌طور مشترک توسط سرما و متیل جاسمونات کنترل می‌شوند. در حالی‌که تنها ۱۳ ماژول برای آنالیز GSEA معنی‌دار بود که در جدول ۲ خلاصه شده‌است.

همان‌گونه که نتایج آنالیز GSEA در جدول ۲ نشان داده است عامل‌های رونویسی فراوانی می‌توانند در مسیرهای ترارسانی JA و سرما نقش داشته باشند. از مهم‌ترین این فاکتورهای رونویسی می‌توان به HY5 (در ماژول‌های سیاه، آبی و صورتی)، PIF3 (در ماژول سیاه)، AtbHLH15 (در ماژول‌های خاکستری و قرمز) AGL15 (ماژول خاکستری)، SEPALLATA3 (در ماژول آبی آسمانی (lightcyan) و بنفش)، AP2 (در ماژول‌های قهوه‌ای، بنفش و آبی آسمانی) و LEC2 (در ماژول خاکستری) اشاره نمود. در این ماژول‌ها، ژن‌های مختلفی توسط این ژن‌ها تنظیم می‌شوند. علاوه‌براین، خانواده‌های عامل رونویسی (AP2-EREBP) APETALA2/Ethylene-Responsive Factor (۱۰ ژن) و tify (پنج ژن) به‌طور معنی‌داری در ماژول خاکستری حضور دارند. پنج ژن خانواده tify در ماژول خاکستری شامل AT1G70700، AT1G74950، AT5G13220، AT1G17380 و AT2G34600 و ژن‌های عضو خانواده AP2-EREBP شامل AT1G64380، AT1G77640، AT4G28140، AT4G25470، AT2G44840، AT1G46768، AT5G67190، AT1G74930، AT2G20880 و AT4G25490 هستند. شبکه رسم شده برای این ژن‌ها در شکل ۲ نشان می‌دهد که دو عامل رونویسی CBF1 و CBF2 از طریق عامل‌های رونویسی ERF13 و ORA47 با پروتئین‌های خانواده tify می‌تواند در ارتباط باشد. خانواده ژنی AP2/ERF شامل عامل‌های رونویسی اختصاصی گیاه است و نقش حیاتی را در فرآیندهای نموی، تحمل تنش‌های زیستی و غیر زیستی و هم‌چنین پاسخ به هورمون‌های گیاهی دارد (Liu et al. 2013; Guo et al. 2016). فاکتورهای رونویسی CBF در فرآیند خوگیری به سرما، تحمل دماهای انجماد و هم‌چنین نمو گیاهچه‌ها نقش ضروری دارند (Jia et al. 2016; Zhao et al. 2016).



شکل ۱- دندروگرام ایجاد شده توسط خوشه‌بندی سلسله مراتبی با استفاده از داده‌های TO برای تعیین ماژول‌های ژنی گیاه آرابیدوپسیس در پاسخ به هورمون جاسمونیک‌اسید وسرما

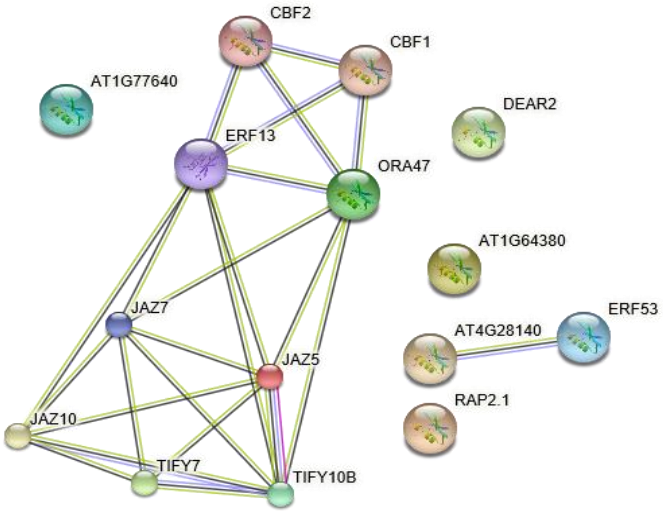
جدول ۲- خلاصه‌ای از نتایج GSEA برای ماژول‌های به‌دست آمده از شبکه هم‌بیانی JA با FDR ≤ 0.05.

Description of gene set (No of probsetIDs in each module)	category	p-value	Description of gene set (No of probsetIDs in each module)	Category	p-value
Module: black (333 probsetIDs)			Module: pink (331 probsetIDs)		
Flavonoid biosynthesis (4)	KEGG	1.4e-4	target genes of TF: HY5 (10)	TFT	1.43e-3
target genes of TF: HY5 (12)	TFT	2.31e-05	target genes of TF: SEPALLATA3 (3)	TFT	1.15e-3
target genes of TF: PIF3 (3)	TFT	1.29e-4	Module: purple (140 probsetIDs)		
Module: blue (1880 probsetIDs)			alpha-Linolenic acid metabolism(5)	KEGG	6.06e-07
target genes of TF: HY5 (52)	TFT	2.44e-10	target genes of TF: AP2 (5)	TFT	1.65e-3
target genes of TF: AtbHLH15 (84)	TFT	2.87e-05	Metabolic pathways(19)	KEGG	1.55e-05
Receptor kinase-like protein family(53)	Gfam	1.45e-08	Module: red (633 probsetIDs)		
Biosynthesis of plant hormones (50)	KEGG	1.51e-07	Metabolic pathways (51)	KEGG	4.62e-05
Biosynthesis of phenylpropanoids (49)	KEGG	1.01e-09	target genes of TF: AtbHLH15 (36)	TFT	3.68e-05
Plant-pathogen interaction(29)	KEGG	9.01e-07	Biosynthesis of phenylpropanoids (18)	KEGG	9.31e-4
Module: brown (1837 probsetIDs)			target genes of TF: AtbZIP60 (4)	TFT	4.48e-05
target genes of TF: AP2 (27)	TFT	4.55e-05	Module: tan (288 probsetIDs)		
Metabolic pathways(158)	KEGG	2.53e-14	Cytochrome P450 ,CYP704A (2)	Gfam	6.95e-05
Photosynthesis(31)	KEGG	6.44e-14	Module: turquoise (2660 probsetIDs		
Carbon fixation in photosynthetic organisms(18)	KEGG	1.16e-05	Ribosome (138)	KEGG	6.8e-52
Biosynthesis of terpenoids and steroids (29)	KEGG	1.02e-4	Metabolic pathways (186)	KEGG	1.48e-08
Porphyrin and chlorophyll metabolism (9)	KEGG	1.92e-4	Methane metabolism (28)	KEGG	1.85e-07
Aquaporin Families ,Delta tonoplast integral protein family (13)	Gfam	3.13e-06	Phenylalanine metabolism (25)	KEGG	3.09e-06
MIP family (13)	Gfam	8.44e-06	Class III peroxidase (25)	Gfam	7.87e-07
Module: cyan (34 probsetIDs)			Module: lightcyan (150 probsetIDs)		
Acyl Lipid Metabolism Family ,Cyclopropane Fatty Acid Synthase(2)	Gfam	1.51e-05	target genes of TF: SEPALLATA3 (6)	TFT	1.14e-4
Plant-pathogen interaction (18)	KEGG	3.81e-06	target genes of TF: AP2 (21)	TFT	1.33e-05
Module: greenyellow (95 probsetIDs)			target genes of TF: AG (8)	TFT	4.25e-4
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism (3)	KEGG	1.98e-4	Starch and sucrose metabolism (12)	KEGG	5.22e-4
Module: grey (244 probsetIDs)			Biosynthesis of plant hormones(26)	KEGG	6.23e-4
target genes of TF: LEC2 (6)	TFT	1.06e-08	Metabolic pathways (82)	KEGG	2.14e-05
AP2-EREBP TF Family (10)	Gfam	2.81e-07	Plant-pathogen interaction (18)	KEGG	4.02e-05
tify family (5)	Gfam	8.43e-07			
target genes of TF: AtbHLH15 (19)	TFT	1.12e-05	Putative target of miR157 (2)	MIR	1.92e-4
Circadian rhythm – plant (4)	KEGG	1.25e-4	PP2C-type phosphatases (3)	Gfam	3.86e-05
target genes of TF: AGL15 (3)	TFT	9.58e-4	Inositol phosphate metabolism (3)	KEGG	1.54e-3
Glycosyltransferase Gene Families (6)	Gfam	3.58e-4	Phosphatidylinositol signaling system (3)	KEGG	1.23e-3

TF: transcription factor; TFT: Transcription Factor Targets; Gfam: Gene Family; MIR; MicroRNA targets; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

عامل رونویسی ORA47 نیز به‌عنوان عضوی از خانواده AP2/ERF بیوسنتز JA را تنظیم می‌کند و توسط تیمار متیل‌جاسمونات القا می‌شود. بر اساس مطالعات انجام شده تعداد زیادی از ژن‌های مسیر پیام و بیوسنتز JA و ABA تحت شرایط تنش به‌طور مستقیم هدف تنظیمی این عامل رو نویسی قرار می‌گیرند (Chen et al. 2016). عامل‌های رونویسی ORA47 و ERF13 می‌تواند به‌عنوان یکی از عوامل مهم درمسیر ترارسانی JA در پاسخ به سرما معرفی شوند و احتمالاً حدواسطی در مسیر ترارسانی JA و سرما هستند به‌خصوص که برخی ژن‌های خانواده tify در مسیر پیام‌رسانی JA نقش دارند، این پروتئین‌ها حاوی دمین JAsmonate-ZIM (JAZ) بوده و قادر هستند تا با اتصال مستقیم به عامل‌های رونویسی MYC2 بیان ژن‌های مسیر ترارسانی JA را متوقف کنند (Thireault et al. 2015). از سوی دیگر مشخص شده‌است که JA به عنوان یک پیام‌رسان مهم در بالادست مسیر ICE-CBF/DREB1 – که یکی از مسیرهای مهم در پاسخ و ایجاد مقاومت به سرما در گیاه آرابیدوپسیس است عمل می‌کند و در افزایش تحمل به یخزدگی در آرابیدوپسیس نقش دارد. ژن‌هایی مسیر CBF/DREB1 القا شده به‌وسیله سرما، توسط JA نیز تنظیم مثبت می‌شود. بررسی‌های قبلی نشان داده است که چندین پروتئین JAZ، JAZ1 و JAZ4، سرکوب‌گر مسیر ترارسانی JA، از نظر فیزیکی با عامل‌های رونویسی ICE1 و ICE2 در ارتباط هستند (Yanru Hu et al. 2013). در برخی ماژول‌ها ژن‌ها توسط عامل‌های رونویسی HY5، bHLH15 و PIF3 تنظیم می‌شوند (جدول۲). مطالعات نشان داده است که این

عامل‌های رونویسی در مسیر ترارسانی فیتوکروم‌ها نقش دارند و پاسخ‌های گیاه به نور را تنظیم می‌کنند (Duek and Fankhauser 2005; Castillon et al. 2007). مطالعات پیشین نشان داده است که دو عامل رونویسی AtbHLH15 و HY5 با یکدیگر همکاری می‌کنند تا فتومورفوژنز و پاسخ به جیبرلیک‌اسید را تنظیم کنند و در انتقال ترارسانی دمایی شرکت می‌کند (Toledo-Ortiz et al. 2014). فیتوکروم‌ها گیرنده‌های نوری در گیاه می‌باشند که نقش مهمی را در رشد و نمو گیاهان در پاسخ به شرایط محیطی در گیاهان بازی می‌کند (Casal et al. 2003). انتقال ترارسانی فیتوکروم‌ها به‌طور منفی توسط bHLH کنترل می‌شود (Sailsbery and Dean 2012). شواهدی نیز برای ارتباط میان بیوسنتز و مسیر پیام JA و PhyA یافت شده‌است (Svyatyna and Riemann 2012). علاوه براین، مطالعات زیادی مشخص کرده است که فیتوکروم‌ها در تنش‌های زیستی و غیر زیستی درگیر می‌باشند (Carvalho et al. 2011). برای مثال، عامل رونویسی CBF/DREB1 به‌وسیله PIF7 تحت ریتم شبانه‌روزی در برگ‌های آرابیدوپسیس تنظیم منفی می‌شود (Kidokoro et al. 2009).

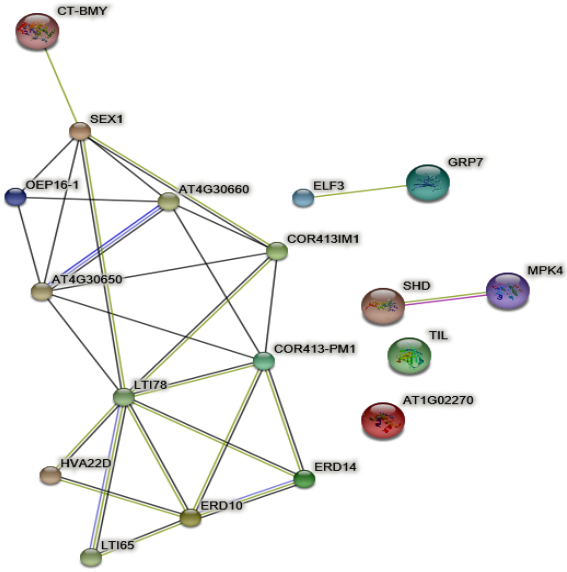


شکل ۲- شبکه ژنی رسم شده توسط سایت string برای ژن‌های خانواده tify و AP2-EREBP گیاه آرابیدوپسیس در ماژول خاکستری.

پروتئین PhyB تحت عنوان گیرنده نوری تعیین شده‌است که توسط مسیر انتقال پیام سرما را در پاسخ به نور فعال می‌کند. در حقیقت، فیتوکروم‌ها به‌عنوان نقطه اتصالی میان پیام نور وسرما در مرحله‌ای پیش از بیان ژن *CBFs* پیشنهاد شده‌است (Kim et al. 2002). عامل رونویسی HY5 در خوگیری به سرما نقش داشته و به‌طور مثبت تعداد زیادی از ژن‌های القا شونده به‌وسیله سرما را کنترل می‌کند. علاوه بر این، HY5 در تقابل با PIFs عمل می‌کند تا ظرفیت فتوسنتز را در دماهای پایین تعدیل کند. تعداد پیگمان‌های فتوسنتزی به‌وسیله HY5 افزایش می‌یابد تا سطوح کلروفیلII و جذب CO2 در پاسخ به دماهای پایین کنترل کند. تغییرات ناگهانی در شرایط نور و دما تغییرات در فراوانی HY5 و PIFs را هدف‌گذاری می‌کند که بیان ژن‌های هدف را تعدیل کند تا عملکرد فتوسنتز و رشد را بهینه سازد (Toledo-Ortiz et al. 2014). بنابراین، HY5 احتمالاً نقش میانجی را در پاسخ‌های گیاه به نور و دما ایفا می‌کند. علاوه‌براین، PIF3 به‌عنوان تنظیم کننده منفی نمو کلروپلاست عمل می‌کنند (Stephenson et al. 2009). عامل‌های رونویسی PIF1، PIF3 و HY5 به‌عنوان پلی میان ترارسانی ROS و نور معرفی شده‌اند که مرگ سلولی و پاسخ‌های اکسیداتیو نوری را تنظیم می‌کنند (Chen et al. 2013). هر دو عامل HY5 و PIF3 به‌طور مثبت بیوسنتز آنتوسیانین را از طریق فعالسازی رونویسی ژن‌های بیوسنتز آنتوسیانین کنترل می‌کند و اثر مثبت PIF3 نیازمند حضور HY5 می‌باشد (Shin et al. 2007). هورمون JA در رفتاری وابسته به phA سبب تجمع آنتوسیانین می‌شود (Li et al. 2014). همان‌گونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، ژن‌های پاسخ‌دهنده به دو عامل رونویسی HY5 و PIF3 و هم‌چنین حضور معنی‌دار چهار ژن درگیر در بیوسنتز فلاونوئید (پیش‌ساز آنتوسیانین) در ماژول سیاه، تأییدی بر مطالعات گذشته می‌باشد. از سوی دیگر مشخص شده‌است که میان بیان ژن آنتوسیانین سینتاز با تجمع آنتوسیانین و تحمل سرما در گیاه *Brassica rapa* همبستگی بالایی وجود دارد (Ahmed et al. 2015). بنابراین، می‌توان این مسیر را به‌عنوان یکی از مسیرهای ایجاد مقاومت و ترارسانی در مقاومت به سرما معرفی کرد و احتمالاً یکی از نقاط مشترک میان سرما و JA است.

ماژول قرمز (red) با ٦٣٣ ژن را اختصاصی پاسخ به سرما می‌توان نامید. در این ماژول ۱۸ ژن پاسخ‌دهنده به سرما (GO:0009409) بودند. علاوه‌براین، سایر عبارت‌های تجزیه GO نیز درگیر در واکنش گیاهان به سرما می‌باشد که در میان آن‌ها می‌توان به ۲۳

ژن در تاخوردگی پروتئین (GO:0006457)، ۱۰ ژن در فرآیند سوخت و ساز دی‌ساکاریدها (GO:0005984)، شش ژن در فرآیند ساخت مونوساکاریدها (GO:0046364) و شش ژن در فرآیند کاتابولیکی پلی‌ساکاریدها (GO:0000272) اشاره نمود. ۹۵ ژن در این ماژول پاسخ دهنده به تنش (GO:0006950) و ۲۰۸ ژن در فرآیند سوخت و ساز اولیه (GO:0044238) نقش دارند. در میان تنش‌های دیگر می‌توان به تنش‌های شوری (GO:0009651)، اسمزی (GO:0006970)، یون کادمیوم (GO:0046686) و کمبود آب (GO:0009414) اشاره کرد. این امر نشان دهنده اشتراک میان فرآیندهای پاسخ به تنش سرما با فرآیندهای درگیر در سایر تنش‌ها است.



شکل ۳- شبکه ژنی رسم شده توسط سایت string برای ژن‌های دخیل در پاسخ به سرمای گیاه آرابیدوپسیس در ماژول قرمز

شبکه ژنی برای ژن‌های پاسخ دهنده به سرما با استفاده از سایت string رسم شد (شکل ۳). در این شبکه ژنی که بر اساس مطالعات پیشین و برهمکنش میان پروتئین‌ها رسم شده‌است همه ژن‌ها با هم برهمکنش ندارند، در حالی که شبکه بیانی ایجاد شده در اینجا بیانگر این نکته است که در پاسخ به سرما و JA هم‌بیان می‌باشند و احتمالاً با همکاری یکدیگر در کنترل مسیر ترارسانی خاصی نقش دارند. از جمله این ژن‌ها می‌توان به دو ژن *AT4G30650* و *AT4G30660* از خانواده (Rare Cold Inducible) RCI2 اشاره کرد که پروتئین‌های کوچک آب‌گریز هستند که در پاسخ گیاهان به تنش‌های مختلف از جمله دماهای پایین، خشکی و گرما نقش دارند (Medina et al. 2001; Khurana et al. 2015). بیان ژن *RCI2A* به‌عنوان عضوی از این خانواده تحت تأثیر مسیرهای ترارسانی سرما، هورمون ABA، دهیدراسیون و نمک NaCl می‌باشد که این مسیرهای ترارسانی در چندین سطح دارای هم‌پوشانی هستند (Medina et al. 2005). پنج ژن نیز در فرآیند کاتابولیکی کربوهیدرات‌ها (*AT4G01370*، *AT1G10760*، *AT4G24190*، *AT4G17090* و *AT2G21660*) از جمله نشاسته (*AT1G10760* و *AT4G17090*) جز این گروه ژنی می‌باشد. مطالعات نشان داده که فرآیند خوگیری گیاهان به سرما همراه با تجمع قندهای محلول ازجمله ساکارز است که به‌عنوان یکی از فرآیندها در اکتساب خوگیری و تحمل دماهای انجماد نقش دارد (Theocharis et al. 2012). هم‌چنین در طی خوگیری به سرما در غلات و گراس‌ها میزان فروکتان‌ها افزایش می‌یابد، فروکتان پلیمری از فروکتوز مشتق شده از ساکارز است که برای پایداری غشا سلولی به کار گرفته می‌شود (Janská et al. 2010; Theocharis et al. 2012). حضور هم‌زمان ژن‌های پاسخ‌دهنده به سرما و ژن‌های مرتبط با کربوهیدرات‌ها بیانگر نقش کلیدی آن‌ها در پاسخ‌های گیاه به سرما دارد، علی‌الخصوص که کربوهیدرات‌ها به عنوان ملکول‌های ترارسانی در گیاهان شناخته شده‌اند (Hellmann and Smeekens 2014).

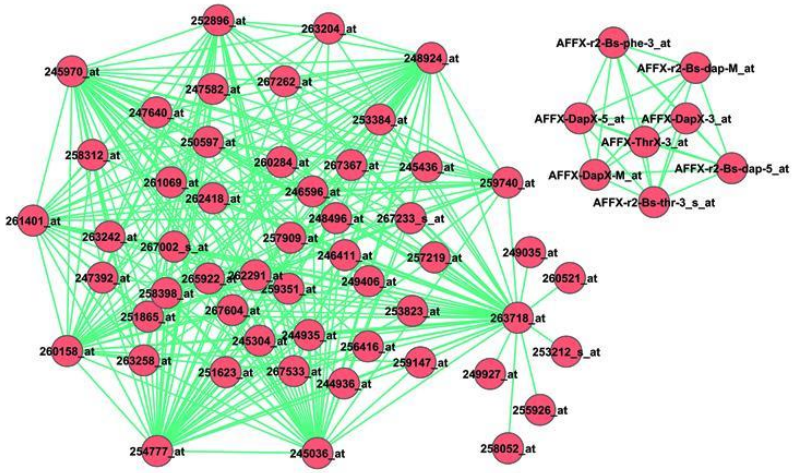
با بررسی توالی پروموتری این ژن‌ها مشخص شد که عوامل رونویسی مشترک شامل برخی از اعضای خانواده‌های WRKY، Dof، AT-Hook، Myb/SANT، AP2; ERF، Dehydrin، Trihelix، bHLH، bZIP، SBP، ZF-HD و GATA; tify هستند. نتایج GSEA در جدول ۲ نیز نشان داده است که برخی از این عوامل رونویسی هم‌چون AP2، bHLH و tify نقش معنی‌داری در کنترل سایر ژن‌ها می‌تواند داشته باشد. همان‌گونه که پیش از این بیان شد اعضای خانواده ژنی tify نقش کلیدی در مسیر ترارسانی JA دارد و احتمالاً JA از طریق ژن‌های این خانواده بتواند پاسخ‌های گیاه به سرما را کنترل کند.

ماژول قهوه‌ای به فتوسنتز اختصاص دارد. بر اساس نتایج حاصل از GO، ۷۷ ژن درفتوسنتز (GO:0015979) و ۷۵۵ ژن در فرآیند

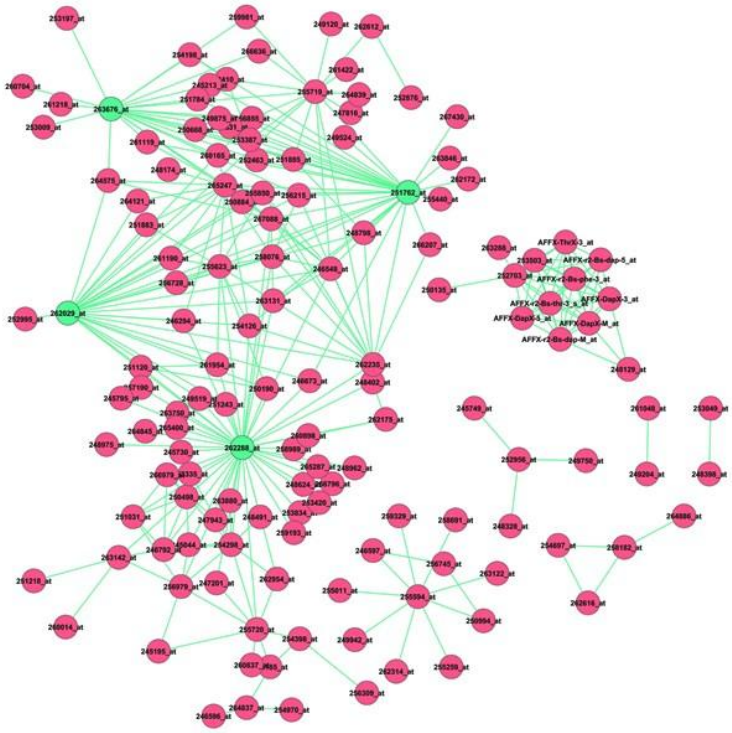
سوخت و ساز (GO:0008152) نقش دارند. هم‌چنین ۱۷۰ ژن به القاگرهای غیر زیستی پاسخ می‌دهند که شامل ۸٤ ژن پاسخ‌دهنده به نور (GO:0009416) و ٤۰ ژن پاسخ‌دهنده به سرما (GO:0009409) و ۳٤ ژن پاسخ‌دهنده به کادمیوم (GO:0046686) است. علاوه‌براین ٦۰ ژن در فرآیند سوخت و ساز کربوهیدرات‌ها (GO:0044262)، ۲۷ ژن در فرآیند کاتابولیکی کربوهیدرات‌ها (GO:0016052) و ۱۸ ژن در فرآیند تولید کلروفیل II (GO:0015994) نقش دارند. نتایج GSEA نیز تاکید کننده این نکته می‌باشد که ژن‌های موجود در این ماژول در فرآیند سرما درگیر می‌باشند و ارتباط نزدیکی میان فرآیند فتوسنتز و سرما وجود دارد. شبکه ژنی برای ۳۰۰ همبند برتر این ماژول هم برای سرما و هم برای JA رسم شد (شکل‌های ٤ و ٥). همان‌گونه که در شکل نیز مشخص است همه ژن‌ها با یکدیگر در ارتباط نمی‌باشند. شبکه سرما برای این ماژول دارای ۱٤۱ گره یا ژن می‌باشد. ۱۰۱ ژن آن در کلروپلاست سلول فعالیت دارند که ۱٤ ژن آن در فرآیند فتوسنتز (254970_at، 261422_at، 262612_at، 251762_at، 254298_at، 266979_at، 251218_at، 256309_at، 262288_at، 259193_at، 265287_at، 251784_at، 248402_at و 245195_at) نقش دارند و هفت ژن نیز پاسخ دهنده به سرما (255720_at، 255720_at، 246596_at، 251885_at، 262029_at، 263676_at و 264845_at) هستند. شبکه ژنی برای ۳۰۰ همبند برتر این ماژول برای داده‌های JA رسم شد. (شکل ٤) که حاوی ٦۰ گره یا ژن می‌باشد. شبکه ترسیم شده دارای دو گروه مجزا است. یکی از این گروه‌ها دارای ۵۲ ژن با ارتباط قوی است. ۱۷ ژن آن متعلق به کلروپلاست است.

فتوسنتز فرآیند بسیار دقیقی است که به هر گونه تغییر در شرایط محیطی حساسیت بالایی دارد، زیرا لازم است تا تعادل میان جذب انرژی نور به وسیله دستگاه فتوسیستم با انرژی مصرف شده در فرآیندهای سوخت و ساز گیاهان وجود داشته باشد. دمای پایین، عدم تعادل میان منبع انرژی و مخزن سوخت و ساز را به هم می‌زند بنابراین نیاز به تعدیل فتوسنتز است تا تعادل جریان انرژی حفظ شود. علاوه‌براین، فتوسنتز خودش به‌عنوان گیرنده این عدم تعادل از طریق وضعیت ردوکس (Redox) ترکیبات انتقال‌دهنده الکترون در فتوسنتز عمل می‌کند. فرآیند فتوسنتز با فرآیندهای دیگری هم‌چون خوگیری به سرما درگیر است و میان وضعیت ردوکس دستگاه فتوسنتز، خوگیری به سرما و مسیرهای ترارسانی قند برهمکنش وجود دارد تا خوگیری گیاهان به دمای پایین تنظیم شود (Ensminger et al. 2006).

در این مطالعه، شبکه هم‌بیانی وزن‌دار برای تعیین چگونگی تأثیر JA بر سرما در گیاه آرابیدوپسیس ایجاد شد. نتایج فتوسنتز و فرآیندهای مرتبط با کربوهیدرات‌ها را از مهم‌ترین فرآیندهای احتمالی کنترل شونده توسط JA و سرما نشان داد که احتمالاً به دلیل کنترل دقیق سوخت و ساز گیاهی در دماهای پائین است.



شکل ٤- شبکه ژنی ترسیم شده توسط نرم‌افزار Cytoscape برای ۳۰۰ همبند برتر ماژول قهوه‌ای با توجه به داده‌های JA در آرابیدوپسیس



شکل ۵- شبکه ژنی ترسیم شده توسط نرم‌افزار Cytoscape برای ۳۰۰ همبند برتر ماژول قهوه‌ای با توجه به داده‌های سرما در آرابیدوپسیس

علاوه‌براین، نتایج نشان داد که عامل‌های رونویسی زیادی در کنترل این فرآیند نقش ایفا می‌کنند. دو عامل رونویسی ERF13 و ORA47 کاندیدایی برای ارتباط میان جاسمونیک‌اسید و تحمل به سرما می‌باشد و حدواسطی میان عامل‌های رونویسی پاسخ دهنده به سرما CBF1 و CBF2 و پروتئین‌های تنظیم‌کننده در مسیر ترارسانی JA از خانواده tify هستند. هم‌چنین سه عامل رونویسی HY5، bHLH15 و PIF3 نیز احتمالاً در این مسیر ترارسانی با یکدیگر همکاری می‌کنند تا گیاه پاسخ مناسبی به دماهای پایین دهند.

منابع

Ahmed NU, Park J-I, Jung H-J, Hur Y, Nou I-S (2015) Anthocyanin biosynthesis for cold and freezing stress tolerance and desirable color in *Brassica rapa*. Functional & Integrative Genomics 15: 383-394.

Bergmann S, Ihmels J, Barkai N (2004) Similarities and differences in genome-wide expression data of six organisms. PLoS Biology 2: 85-93.

Bolt S, Zuther E, Zintl S, Hincha DK, Schmülling T (2017) ERF105 is a transcription factor gene of *Arabidopsis thaliana* required for freezing tolerance and cold acclimation. Plant, Cell & Environment 40: 108-120.

Carvalho RF, Campos ML, Azevedo RA (2011) The role of phytochrome in stress tolerance. Journal of Integrative Plant Biology 53: 920-929.

Casal JJ, Luccioni LG, Oliverio KA, Boccalandro HE (2003) Light, phytochrome signalling and photomorphogenesis in *Arabidopsis*. Photochemical and Photobiological Sciences 2: 625-636.

Castillon A, Shen H, Huq E (2007) Phytochrome interacting factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. Trends in Plant Science 12: 514-521.

Cerrudo I, Keller MM, Cargnel MD, Demkura PV, de Wit M, Patitucci MS, Pierik R, Pieterse CM, Ballaré CL (2012) Low red/far-red ratios reduce *Arabidopsis* resistance to *Botrytis cinerea* and jasmonate responses via a COI1-JAZ10-dependent, salicylic acid-independent mechanism. Plant Physiology 158: 2042-2052.

Chan Z, Wang Y, Cao M, Gong Y, Mu Z, Wang H, Hu Y, Deng X, He XJ, Zhu JK (2016) RDM4 modulates cold stress resistance in *Arabidopsis* partially through the CBF-mediated pathway. New Phytologist 209: 1527-1539.

Chen D, Xu G, Tang W, Jing Y, Ji Q, Fei Z, Lin R (2013) Antagonistic basic helix-loop-helix/bZIP transcription factors form transcriptional modules that integrate light and reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. The Plant Cell 25: 1657-1673.

Chen HY, Hsieh EJ, Cheng MC, Chen CY, Hwang SY, Lin TP (2016) ORA47 (octadecanoid-responsive AP2/ERF-domain transcription factor 47) regulates jasmonic acid and abscisic acid biosynthesis and signaling through binding to a novel cis-element. New Phytologist 211: 599-613.

Chen YA, Wen YC, Chang WC (2012) AtPAN: an integrated system for reconstructing transcriptional regulatory networks in *Arabidopsis thaliana*. BMC Genomics 13: 85.

Dong J, Horvath S (2007) Understanding network concepts in modules. BMC Systems Biology 1: 24.

Du Z, Zhou X, Ling Y, Zhang Z, Su Z (2010) agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. Nucleic Acids Research 38:64-70.

Duek PD, Fankhauser C (2005) bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling. Trends in Plant Science 10: 51-54.

Ensminger I, Busch F, Huner N (2006) Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis. Physiologia Plantarum 126: 28-44.

Gaudet D, Wang Y, Frick M, Puchalski B, Penniket C, Ouellet T, Robert L, Singh J, Laroche A (2011) Low temperature induced defence gene expression in winter wheat in relation to resistance to snow moulds and other wheat diseases. Plant Science 180: 99-110.

Guo B, Wei Y, Xu R, Lin S, Luan H, Lv C, Zhang X, Song X, Xu R (2016) Genome-Wide Analysis of APETALA2/Ethylene-Responsive Factor (AP2/ERF) Gene Family in Barley (*Hordeum vulgare* L.). PLoS ONE 11: e0161322.

Hellmann HA, Smeekens S (2014) Sugar sensing and signaling in plants. Frontiers in Plant Science 5: 113.

Hu P, Zhou W, Cheng Z, Fan M, Wang L, Xie D (2013) JAV1 controls jasmonate-regulated plant defense. Molecular Cell 50: 504-515.

Hu Y, Jiang L, Wang F, Yu D (2013) Jasmonate regulates the inducer of *CBF* expression–c-repeat binding factor/DRE binding factor1 cascade and freezing tolerance in *Arabidopsis*. The Plant Cell 25: 2907-2924.

Janská A, Maršík P, Zelenková S, Ovesná J (2010) Cold stress and acclimation–what is important for metabolic adjustment? Plant Biology 12: 395-405.

Jia Y, Ding Y, Shi Y, Zhang X, Gong Z, Yang S (2016) The cbfs triple mutants reveal the essential functions of CBFs in cold acclimation and allow the definition of CBF regulons in *Arabidopsis*. New Phytologist 212: 345-353.

Khurana N, Chauhan H, Khurana P (2015) Characterization of a chloroplast localized wheat membrane protein (TaRCI) and its role in heat, drought and salinity stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Plant Gene 4: 45-54.

Kidokoro S, Maruyama K, Nakashima K, Imura Y, Narusaka Y, Shinwari ZK, Osakabe Y, Fujita Y, Mizoi J, Shinozaki K (2009) The phytochrome-interacting factor PIF7 negatively regulates *DREB1* expression under circadian control in *Arabidopsis*. Plant Physiology 151: 2046-2057.

Kim D-H, Doyle MR, Sung S, Amasino RM (2009) Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. Annual Review of Cell and Developmental 25: 277-299.

Kim HJ, Kim YK, Park JY, Kim J (2002) Light signalling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 29: 693-704.

Kolaksazov M, Laporte F, Ananieva K, Dobrev P, Herzog M, Ananiev E (2013) Effect of chilling and freezing stresses on jasmonate content in *Arabis alpina*. Bulgarian Journal of Agricultural Science 19: 15-17.

Kosová K, Prášil IT, Vítámvás P, Dobrev P, Motyka V, Floková K, Novák O, Turečková V, Rolčik J, Pešek B (2012) Complex phytohormone responses during the cold acclimation of two wheat cultivars differing in cold tolerance, winter Samanta and spring Sandra. Journal of Plant Physiology 169: 567-576.

Langfelder P, Horvath S (2008) WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. BMC Bioinformatics 9: 559.

Lee B-h, Henderson DA, Zhu J-K (2005) The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. The Plant Cell 17: 3155-3175.

Li T, Jia K-P, Lian H-L, Yang X, Li L, Yang H-Q (2014) Jasmonic acid enhancement of anthocyanin accumulation is dependent on phytochrome A signaling pathway under far-red light in *Arabidopsis*. Biochemical and Biophysical Research Communications 454: 78-83.

Liu S, Wang X, Wang H, Xin H, Yang X, Yan J, Li J, Tran L-SP, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Qin F (2013) Genome-wide analysis of *ZmDREB* Genes and their association with natural variation in drought tolerance at seedling stage of *Zea mays* L. PLOS Genetics 9: e1003790.

Lozano-Durán R, García I, Huguet S, Balzergue S, Romero LC, Bejarano ER (2012) Geminivirus C2 protein represses genes involved in sulphur assimilation and this effect can be counteracted by jasmonate treatment. European Journal of Plant Pathology 134: 49-59.

Mandaokar A, Thines B, Shin B, Markus Lange B, Choi G, Koo YJ, Yoo YJ, Choi YD, Choi G, Browse J (2006) Transcriptional regulators of stamen development in *Arabidopsis* identified by transcriptional profiling. The Plant Journal 46: 984-1008.

Medina J, Rodríguez-Franco M, Peñalosa A, Carrascosa MJ, Neuhaus G, Salinas J (2005) *Arabidopsis* mutants deregulated in *RCI2A* expression reveal new signaling pathways in abiotic stress responses. The Plant Journal 42: 586-597.

Medina Jn, Catalá R, Salinas J (2001) Developmental and stress regulation of *RCI2A* and *RCI2B*, two cold-inducible genes of *Arabidopsis* encoding highly conserved hydrophobic proteins. Plant Physiology 125: 1655-1666.

Mueller S, Hilbert B, Dueckershoff K, Roitsch T, Krischke M, Mueller MJ, Berger S (2008) General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids

through TGA transcription factors in *Arabidopsis*. The Plant Cell 20: 768-785.
Nakamura T, Ishikawa M, Nakatani H, Oda A (2008) Characterization of cold-responsive extracellular chitinase in bromegrass cell cultures and its relationship to antifreeze activity. Plant Physiology 147: 391-401.
Sailsbery JK, Dean RA (2012) Accurate discrimination of bHLH domains in plants, animals, and fungi using biologically meaningful sites. BMC Evolutionary Biology 12: 1.
Shin J, Park E, Choi G (2007) PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in *Arabidopsis*. The Plant Journal 49: 981-994.
Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang P-L, Ideker T (2011) Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. Bioinformatics 27: 431-432.
Stephenson PG, Fankhauser C, Terry MJ (2009) PIF3 is a repressor of chloroplast development. Proceedings of the National Academy of Sciences 106: 7654-7659.
Svyatyna K, Riemann M (2012) Light-dependent regulation of the jasmonate pathway. Protoplasma 249: 137-145.
Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP (2014) STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. Nucleic Acids Research: gku1003.
Theocharis A, Clément C, Barka EA (2012) Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. Planta 235: 1091-1105.
Thireault C, Shyu C, Yoshida Y, St Aubin B, Campos ML, Howe GA (2015) Repression of jasmonate signaling by a non-TIFY JAZ protein in *Arabidopsis*. The Plant Journal 82: 669-679.
Toledo-Ortiz G, Johansson H, Lee KP, Bou-Torrent J, Stewart K, Steel G, Rodríguez-Concepción M, Halliday KJ (2014) The HY5-PIF regulatory module coordinates light and temperature control of photosynthetic gene transcription. PLoS Genetics 10: e1004416.
Turner JG, Ellis C, Devoto A (2002) The jasmonate signal pathway. The Plant Cell Online 14: S153-S164.
Yi X, Du Z, Su Z (2013) PlantGSEA: a gene set enrichment analysis toolkit for plant community. Nucleic Acids Research 41: W98-W103.
Zhang B, Horvath S (2005) A general framework for weighted gene co-expression network analysis. Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology 4.
Zhao C, Zhang Z, Xie S, Si T, Li Y, Zhu JK (2016) Mutational evidence for the critical role of CBF transcription factors in cold acclimation in *Arabidopsis*. Plant Physiology 171: 2744-2759.