

الگوی بیان ژن‌های مرتبط با فرایند متابولیک ماکرو مولکول‌ها تحت تنش سرما در بادام (*Prunus dulcis* Mill) از طریق تجزیه RNA-seq

Expression of genes related to macromolecule metabolic process under cold stress in almond (*Prunus dulcis* Mill) using RNA-seq analysis

ارغوان علی سلطانی^۱، بهروز شیران^{۱*}، اسماعیل ابراهیمی^۲، حسین فلاحتی^۳، صادق موسوی^۴، علی ایمانی^۵، سعاد الله هوشمند^۱

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، دانشیار، دانشگاه شهرکرد، ایران.

۲- استادیار، دانشگاه شیراز، ایران

۳- استادیار، دانشگاه رازی کرمانشاه، ایران

۴- استادیار، دانشگاه لرستان

۵- دانشیار، موسسه اصلاح و بذر و نهال کرج، ایران

AliSoltani A¹, Shiran B^{*1}, Ebrahimi E², Fallahi H³, Mousavi S⁴, Imani A⁵, Houshmand S¹

1. PhD Student, Professor, Associate Professor, Shahrekord University, Iran.

2. Assistant Professor, Shiraz University, Iran.

3. Assistant Professor, Razi University, Iran.

4. Assistant Professor, Lorestan University, Iran.

5. Associate Professor, Seed and Plant Improvement Institute (SPII), Karaj, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: beshiran45@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۸)

چکیده

روش RNA-seq توانایی زیادی در تشخیص و بررسی بیان ژن‌ها تحت تنش‌های غیرزیستی در سطح ترنسکریپتوم دارد. در این مطالعه فرایندهای اصلی مرتبط با تنش یخ‌زدگی در تخمدان بادام با استفاده از روش RNA-seq بررسی شد. پس از اعمال تنش سرما RNA کل از نمونه‌های کنترل و تنش توالی‌یابی شد و مقایسه بیان ژن بر روی نمونه‌ها صورت گرفت. نتایج نشان داد که ۳۵۸ ژن از کل ژن‌های تغییر بیان یافته، در فرایند متابولیک ماکرومولکول-ها دخیل بودند. نتایج نشان داد که این ژن‌ها عمدتاً دارای دمن‌های کیناز، LRR، Ap2، phytochrome و برخی انواع دیگر دمن بودند. مطالعات پیشین اهمیت این دمن‌ها و انواع پروتئین کینازها را در پروتئین‌های القا شونده تحت تنش سرما گزارش کرده‌اند. همچنین افزایش بیان بالا در ژن‌های 40S ribosomal protein و NAC، پیشنهاد می‌کند که حداقل بخشی از این ژن‌های مرتبط با تحمل به سرما بود و احتمالاً این ژن‌ها دارای پتانسیل بالایی برای کاربرد در برنامه‌های اصلاحی تحت تنش‌های مختلف در بادام و سایر گونه‌های Rosaceae می‌باشند.

واژه‌های کلیدی

بادام

بیان ژن

تنش یخ‌زدگی

فرایند متابولیک

RNA-seq

مقدمه

درخت بادام با نام علمی *Prunus dulcis* Mill. متعلق به خانواده Rosacea می‌باشد. بادام یکی از قدیمی‌ترین محصولات خشکباری به شمار می‌آید که امروزه بالاترین میزان تولید را در میان این گونه محصولات به خود اختصاص داده است. خاصیت انباری بسیار بالا، سهولت نگهداری و حمل و نقل، ضایعات کم، قابلیت بالای صادرات و ظرفیت کشت بادام در کشور سبب شده که افزایش سطح زیر کشت آن در طول برنامه‌های توسعه جزو اصلی‌ترین اهداف زیر بخش باغبانی قرار گیرد (Imani 2011; Imani et al. 2012). از مشکلات عمده بادام‌کاری کشور، تولید نامنظم بادام می‌باشد که بیشتر به دلیل همزمان نبودن گلدهی ارقام مورد استفاده در باغ، وجود پدیده خودناسازگاری و یا مصادف شدن زمان گلدهی آن‌ها با شرایط سرمای دیررس بهاری می‌باشد (Imani 2011; Alizadeh-Salteh et al. 2012; Imani et al. 2012). به طوری که در بعضی از این سال‌ها این خسارت به میزان ۶۰ تا صد درصد تخمین زده شده است. سرما و یخ‌زدگی بهاره می‌تواند به مراحل فنولوژیکی مختلف گلدهی در بادام خسارت وارد کند (Miranda et al. 2005). همچنین Miranda et al. (2005) نشان دادند که خسارت سرما در بادام بین دماهای ۱- تا ۱۶- درجه سانتی‌گراد از ۱۰ تا ۹۰ درصد می‌تواند منجر به ایجاد خسارت در مراحل فنولوژیکی مختلف شود.

تحت تنش سرما، گیاهان دامنه وسیعی از پاسخ‌ها را در سطوح مولکولی، سلولی و مورفولوژیکی نشان می‌دهند. شناخت نحوه پاسخ و عمل ژن‌ها در تنش می‌تواند اطلاعات بسیار مفیدی در رابطه با نحوه اصلاح گیاهان در جهت تحمل به تنش‌های محیطی فراهم آورد. اهمیت شناخت تنظیم بیان ژن‌ها در تنش سرما توسط محققین بسیاری گزارش شده است (Shinozaki et al. 2003; Chinnusamy et al. 2007). برای شناسایی رونوشت‌ها^۱ روش‌های متعددی بکار برده می‌شود. این روش‌ها شامل مطالعه موردی ژن‌ها شامل روش نورترن بلاتینگ (Brown et al. 2001) و نسخه برداری کمی در زمان واقعی^۲ (Heid et al. 1996) و یا مطالعه وسیع سطوح رونوشت‌ها توسط روش‌هایی همچون تخمین بیان

ژن از طریق ساخت کتابخانه‌های EST (Cushman and Bohnert 2000)، روش ریزآرایه (Schena et al. 1995) و روش RNA-seq (Wang et al. 2009) می‌باشند.

در سال‌های اخیر روش‌های توالی‌یابی با توان بالا^۳ که توالی‌یابی نسل دوم نیز نامیده می‌شوند، حجم بالایی از اطلاعات بیولوژیکی را با هزینه و زمان کم در مقایسه با روش‌های قدیمی فراهم آورده است. جدیدترین و کارآمدترین ابزار برای بررسی رونوشت‌ها، روش‌های توالی‌یابی با توان بالا برای توالی‌یابی cDNA می‌باشند. این تکنولوژی توالی‌یابی شات‌گان ترنسکرپتوم^۴ و یا RNA-seq نامیده می‌شود. روش RNA-seq قادر به شناسایی ایزوفرم‌های ژن، رخدادهای جابجایی^۵، واریانت‌های ژن (شامل انواع SNP ها و SSRs) و تغییرات پس از رونویسی است (Wang et al. 2009). یکی از مهمترین اهداف آزمایشات RNA-seq تشخیص تغییرات بیان ژن‌ها در دو یا چند شرایط متفاوت می‌باشد. سطح بیان هر RNA توسط اندازه‌گیری تعداد قطعات توالی‌یابی شده برای هر رونوشت خاص تعیین می‌شود (Tarazona et al. 2011).

RNA-seq به عنوان روش موثر برای مقایسه بیان RNA در شرایط تنش و غیرتنش در گیاهان مختلف از جمله ذرت، آریدوپسیس، هلو، برنج و گیاهان بسیار دیگری استفاده شده است (Lu et al. 2010; Mizuno et al. 2010; Kakumanu et al. 2013; Socquet-Juglard et al. 2012)، که نشان دهنده اهمیت کارایی این روش در بررسی پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی می‌باشد. اخیراً با استفاده از توالی‌یابی mRNA برنج تحت شرایط تنش شوری ۲۱۳ ژن تغییر بیان یافته در ساقه و ۴۱۹ ژن تغییر بیان یافته در ریشه شناسایی شدند (Mizuno et al. 2010). برای این ۶۳۲ ژن هیچ‌گونه تفسیری^۶ در بانک‌های اطلاعاتی گزارش نشده بود، تنها برخی از آن‌ها پروتئین‌های فرضی را کد می‌کند که در پاسخ به شوری تفاوت بیان نشان می‌دهند. همچنین Kakumanu et al. (2012) ترنسکرپتوم ذرت را با استفاده از روش RNA-seq تحت شرایط کنترل و خشکی بررسی کردند. آن‌ها گزارش

³ High throughput⁴ Shotgun transcriptome sequencing⁵ Translocation⁶ Annotation¹ Transcripts² Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

گزارشی مبنی بر مطالعه ترنسکریپتوم بادام برای تنش‌های مختلف از جمله تنش سرما توسط این روش صورت گرفته است. در این تحقیق شناسایی و بررسی بیان ژن‌های پاسخ به تنش سرما در بافت تخمدان بادام (*Prunus dulcis* Mill.) با استفاده از روش RNA-seq انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تنش

در این بخش ژنوتیپ متحمل به سرما و دیرگل H بادام از مرکز تحقیقات نهال و بذر کرج تهیه شد. از آنجا که هر دوی صفات دیرگلدهی و تحمل به سرما در بادام مهم هستند، ژنوتیپ H به عنوان ژنوتیپ برتر در مقایسه با ژنوتیپ‌های دیگر بادام بر اساس مطالعه اخیر (Mousavi et al. 2014) برای انجام توالی‌یابی در این تحقیق انتخاب شد. در بادام گل انگیزی بر اثر ارسال پیام‌های خاص در مقطع زمانی مشخص و در برخی از مریستم‌های جوانه درختان بالغ بادام اتفاق می‌افتد و منجر به تغییرات مورفولوژیکی و بافتی در این مریستم‌ها می‌شود. به دنبال انگیزش مریستم تمایز یابی و شکل‌گیری طرح‌های اولیه اندام‌های گل آغاز شده و در مراحل مختلف این اندام‌ها به صورت رویانی در گل تشکیل می‌شوند (Lamp et al. 2001). یک مریستم رویشی می‌تواند در چهار مرحله تمایز یافته و اندام‌های گل را تشکیل دهد. این مراحل عبارتند از: انگیزش گل، گل‌انگیزی، تمایز یابی، و گل‌شکفتگی. بررسی‌ها نشان داده که گل‌انگیزی جوانه‌های گل بادام در اوایل شهریور انجام می‌گیرد در حالی‌که برانگیختن سرآغاز کاسبرگ‌ها و انگیزش سرآغاز گلبرگ‌ها در اواخر شهریور انجام می‌شود با این وجود تمایز یابی سرآغاز پرچم‌ها در آخر مهر و مادگی (تخمدان) در اوایل آبان مشاهده می‌شود (Lamp et al. 2001). زمان باز شدن گل‌ها به خصوصیات درخت و شرایط آب و هوایی منطقه بستگی دارد. در شرایط ایران طول گلدهی از اواسط بهمن تا اردیبهشت ماه ادامه می‌یابد (Imani et al. 2012). در زمانی که درخت در مرحله غنچه‌ صورتی^۳ بود (Imani et al. 2012)، بر اساس تکنیک شاخه بریده (Imani et al. 2012; Imani 2011)، اقدام به تهیه شاخه‌های یکساله از قسمت‌های میانی درخت شد.

کردند که در بین دسته‌های آنتولوژی ژن^۱ مرتبط با متابولیسم کربوهیدرات، تغییر در ژن‌های مرتبط با متابولیسم ساکارز و نشاسته در بافت تخمدان اتفاق می‌افتد، که با کاهش میزان نشاسته و فعالیت انتقال ساکارز همراه بوده است، در حالی که در مریستم برگ چنین تغییراتی مشاهده نشد. همچنین آن‌ها گزارش کردند که فرایندهای وابسته به آبسزیک اسید تنها در بافت تخمدان پاسخ مثبت نشان دادند، که این پاسخ‌ها راه‌اندازی تشخیص گلوکز^۲ در سطح پایین را تحت تنش خشکی در تخمدان پیشنهاد می‌کند.

در رابطه با هلو که نزدیکی بسیاری از لحاظ ژنتیکی با بادام دارد نیز مطالعاتی با استفاده از روش‌های توالی‌یابی با توان بالا در تنش‌های مختلف گزارش شده است. اخیراً با استفاده از روش توالی‌یابی شات‌گان و RNA-seq مقایسات گسترده ۱۴ نمونه جمعیتی در هلو به منظور بررسی تنوع، فرایند اهلی شدن و تکامل ژنومی این گیاه انجام شده است. در این مطالعه حدود ۲۷۸۵۲ ژن کدکننده پروتئینی و غیرکدکننده نقشه‌یابی شد (Verde et al. 2013). همچنین مطالعات بررسی الگوی ترنسکریپتوم برای هلو تحت شرایط تنش‌های محیطی انجام شده است. Socquet-Juglard et al. (2013) اثر بیماری‌زایی *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* را در برگ‌های تازه تلقیح شده هلو توسط روش RNA-seq بررسی کرده‌اند. از بین ۱۹۷۸۱ ژن شناسایی شده در هلو تعداد ۳۴ و ۲۶۳ عدد دارای تغییر بیان به ترتیب پس از دو و ۱۲ ساعت تلقیح بودند. بررسی کاتالوگ ژنی نشان داد که پس از دو ساعت تلقیح ژن‌های درگیر در فرایندهای متابولیکی و پاسخ به تنش تغییر بیان پیدا کردند، در مقایسه پس از ۱۲ ساعت تلقیح تعداد بیشتری ژن در فرایندهای سلولی و متابولیکی دچار تغییر شدند. برخی از این ژن‌های تغییر بیان یافته همچون PAMP به طور اختصاصی ژن‌های پاسخ به پاتوژن گزارش شدند. همچنین آن‌ها تعدادی رونوشت جدید که عملکرد آن‌ها نامشخص بوده را نیز گزارش کردند (Socquet-Juglard et al. 2013).

علی‌رغم اهمیت و ارزش روش RNA-seq در شناسایی تعداد بسیار زیادی از ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های گیاهی، تاکنون

^۱ Gene ontology

^۲ Glucose sensing

^۳ Popcorn

(حدود ۶ میلیون خوانش^۱) از سایت ماکروژن دانلود شد و جهت بررسی بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیه RNA-seq و بررسی بیان ژن

پس از بررسی کیفیت داده‌های خام توسط نرم‌افزار FastQC (Andrews 2010) و پیرایش توالی‌ها با Fastx-toolkit (Gordon and Hannon 2010)، قطعات توالی‌یابی شده برای تشکیل کانتیگ‌ها^۲ و یا mRNA کامل هر ژن همگذاری^۳ شد. در واقع همگذاری، همردیف کردن^۴ و اتصال دادن توالی‌های کوتاه اسیدنوکلیک‌ها به منظور احیا و بازسازی توالی اصلی می‌باشد. در این مطالعه به علت عدم وجود ژنوم مرجع در بادام از روش *de novo assembly* توسط نرم‌افزار Trinity (Grabherr et al. 2011) استفاده شد.

عمل شناسایی پروتئین‌ها از طریق تشابه توالی مورد نظر با توالی‌های پروتئینی و یا DNA موجود در بانک‌های اطلاعاتی بر پایه الگوریتم‌های برنامه BLAST (Altschul et al. 1997) انجام شد. در این تحقیق BLAST کانتیگ‌ها توسط Local BLASTx با استفاده از کلاستر کامپیوتر دانشگاه اسلو (http://www.biportal.uio.no) صورت گرفت.

شناسایی ژن‌ها با تغییرات بیان از طریق محاسبه تعداد قطعات نقشه‌یابی شده یک رونوشت خاص در بین کتابخانه‌های مختلف صورت پذیرفت. برای مقایسه بیان از EBseq در نرم‌افزار RSEM استفاده شد (Li and Dewey 2011). داده‌ها تحت نرمال‌سازی، مدل‌سازی آماری از بیان ژن و در نهایت آزمون تفاوت بیان قرار گرفتند. بررسی آنتولوژی ژن‌های تغییر بیان یافته شامل مسیرهای بیولوژیکی ژن‌ها توسط سایت AgriGo (Du et al. 2010) انجام گرفت.

نتایج و بحث

تنش سرما از تنش‌های محیطی مهم است که منجر به نقصان رشد و کاهش عملکرد گیاهان می‌شود. در بادام که به عنوان گیاه استراتژیک برای صادرات در کشور محسوب می‌شود، سرمای

به منظور اعمال تنش ابتدا نمونه‌ها به مدت سه ساعت در دمای صفر درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس دما به ۱- درجه سانتی‌گراد کاهش داده شد و به مدت دو ساعت نمونه‌ها در این دما قرار گرفتند. در مرحله آخر دما به ۲- درجه سانتی‌گراد رسانده شد و به مدت یک ساعت نیز نمونه‌ها در این دما قرار گرفتند و سپس نمونه‌برداری در این مرحله انجام پذیرفت. دما و نوع تنش بر اساس مطالعات پیشین بر روی بادام انتخاب شد (Imani 2011; Imani et al. 2012). نمونه کنترل در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد نمونه‌برداری شد. نمونه‌های تخمدان در نیتروژن مایع به آزمایشگاه منتقل و در یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

استخراج و توالی‌یابی RNA

استخراج RNA کل توسط روش Rubio-Piña and Zapata-Pérez (2011) انجام گرفت. به طور خلاصه پس از کوبیدن حدود ۲۰۰ میلی‌گرم نمونه در نیتروژن مایع، یک میلی‌لیتر بافر استخراج (1.4% (w/v) CTAB; 0.1 M Tris-HCl (pH= 8); 1.4% (w/v) PVPP; 20 mM EDTA (pH 8); 2% (w/v) NaCl) اضافه شد. در ادامه کلروفرم اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه نمونه‌ها در ۴ درجه سانتی‌گراد و $10,621 \times g$ سانتریفیوژ شدند. دو سانتریفیوژ دیگر با شرایط ذکر شده در بالا، در دو مرحله به ترتیب با اضافه کردن فنل:کلروفرم (۱:۱) و کلروفرم:ایزوامیل الکل (۲۴:۱) به مایع رویی انجام شد. در مرحله آخر سانتریفیوژ، به مایع رویی لیتیم کلراید اضافه و به مدت حداقل ۴ ساعت در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از انجام یک مرحله خالص‌سازی توسط فنل: کلروفرم (۱:۱)، آلودگی DNA توسط تیمار با DNaseI برطرف شد (Rubio-Piña and Zapata-Pérez 2011). کمیت و کیفیت RNA توسط روش اسپکتروفوتومتر و ژل ۱/۵ درصد آگارز مخصوص RNA (حاوی فرمالدئید) بررسی شد. نمونه‌ها با کیفیت بالای RNA به طور جداگانه برای بافت تخمدان تحت شرایط نرمال و تنش به منظور توالی‌یابی به شرکت Macrogen کره ارسال شدند. توالی‌یابی با پلت‌فرم (platform) Illumina HiSeq2000 پس از ساخت کتابخانه‌های cDNA انجام گرفت. توالی‌های خام در حد ۱۵۰ جفت باز و میزان 1Gbp داده

¹ Read

² Contigs

³ Assembly

⁴ Aligning

BLASTX با استفاده از کلاستر کامپیوتر دانشگاه اسلو انجام گرفت. میزان کانتینگ‌های شناسایی شده (دارای مشابهت معنی‌دار با پروتئین‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی) برای نمونه کنترل و تنش به ترتیب ۹۳/۴۹ و ۹۳/۱۶ درصد بود (جدول ۱). نتایج نشان داد که ترنسکریپتوم بادام بیشترین میزان مشابهت را با ژنوم هلو دارد. این نتایج با گزارشات قبلی در بررسی و مقایسه ژنوم هلو و بادام مطابقت داشت (Scalabrin et al. 2011).

برای بررسی تفرق بیان تحت شرایط کنترل و تنش سرما ابتدا خوانش‌ها بر روی کانتینگ‌ها نقشه‌یابی شدند و تعداد رونوشت به ازای میلیون^۱ یا TPM توسط RSEM محاسبه شد. در نهایت تفاوت بیان هر کانتینگ با مقایسه TPM کانتینگ در شرایط کنترل و تنش توسط نرم‌افزار EBSeq بدست آمد. بیان تعداد ۵۱۱۲ ژن دارای تفاوت معنی‌دار بود که از بین این ژن‌ها ۲۴۱۵ ژن دارای افزایش بیان و ۴۴۵۵ ژن دارای کاهش بیان بودند.

بررسی آنتولوژی ژن‌های افزایش و کاهش بیان به ترتیب در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. دو فرایند نهایی برای ژن‌های افزایش بیان یافته به ترتیب فرایند متابولیک ماکرومولکول‌ها (۲۴۹ ژن) و بیوسنتز سلولی (۱۶۸ ژن) تشخیص داده شد (شکل ۱). در رابطه با ژن‌های کاهش بیان یافته این فرایندها شامل فرایند متابولیک پروتئین سلولی (۱۵۸ ژن) و متابولیک ماکرومولکول‌ها (۱۰۹ ژن) بود. به طور کلی فرایند متابولیک ماکرومولکول‌ها برای هر دو سری ژن‌های دارای افزایش و کاهش بیان تشخیص داده شد، که احتمالاً نشان‌دهنده اهمیت این فرایند در پاسخ به دمای پایین می‌باشد. بررسی‌های گسترده ترنسکریپتوم در گزارشات قبلی نیز اهمیت فرایند متابولیک ماکرومولکول‌ها را در طی تنش‌های مختلف از جمله سرما و خشکی نشان داده‌اند (Barah et al. 2013; Chen et al. 2013). اخیراً (Chen et al. 2014a) گزارش کردند که تنظیم فرایند متابولیک ماکرومولکول‌ها می‌تواند نقش حسگر تنش سرما را داشته باشد.

برای مطالعه بیشتر این فرایند، ژن‌های این مسیر برای ساختارهای عملکردی شامل دُم^۲ مورد بررسی قرار گرفتند. شکل ۳ انواع مختلف دُم را برای ژن‌های افزایش بیان یافته درگیر در فرایند

دیررس بهاری می‌تواند خسارات را در مراحل فنولوژیک مختلف از ۱۰ تا ۹۰ درصد ایجاد کند و در نتیجه منجر به کاهش تولید شود (Miranda et al. 2005). در این مطالعه برای اولین بار بررسی ترنسکریپتوم بافت تخمدان بادام تحت تنش سرما صورت پذیرفت. داده‌های خام ترنسکریپتوم بر روی sequence read archive (SRA) در سایت NCBI با شماره SRX521204 قرار گرفته‌اند.

تعداد توالی‌های بدست آمده به اصطلاح خوانش‌ها در دو نمونه کنترل و تنش بافت تخمدان به ترتیب شامل ۶۹۶۳۲۴۶ و ۶۲۲۳۵۵۶ بود. نوع سیستم توالی‌یابی و نحوه ساخت کتابخانه cDNA بر روی طول و تعداد خوانش‌های بدست آمده تاثیر دارد (جدول ۱). (Socquet-Juglard et al. 2013) با استفاده از پلت فرم Illumina genome analyzer در حدود 50 میلیون خوانش در هلو توالی‌یابی کردند، در حالی که (Chen et al. 2014b) با استفاده از پلت فرم 454S-FLX در حدود یک و نیم میلیون خوانش در دو کتابخانه هلو ارزیابی کردند. طول قطعات توالی‌یابی در هر دو نمونه ۱۰۱ نوکلئوتید بود، و محتوای GC برای نمونه کنترل ۴۶ درصد و برای نمونه تنش ۴۵ درصد محاسبه شد. محتوای GC بدست آمده در این مطالعه با ترانسکریپتوم هلو (۴۴ درصد) تقریباً مشابه و در مقایسه با گیلان (۴۲ درصد) کمی بیشتر بود (Socquet-Juglard et al. 2013).

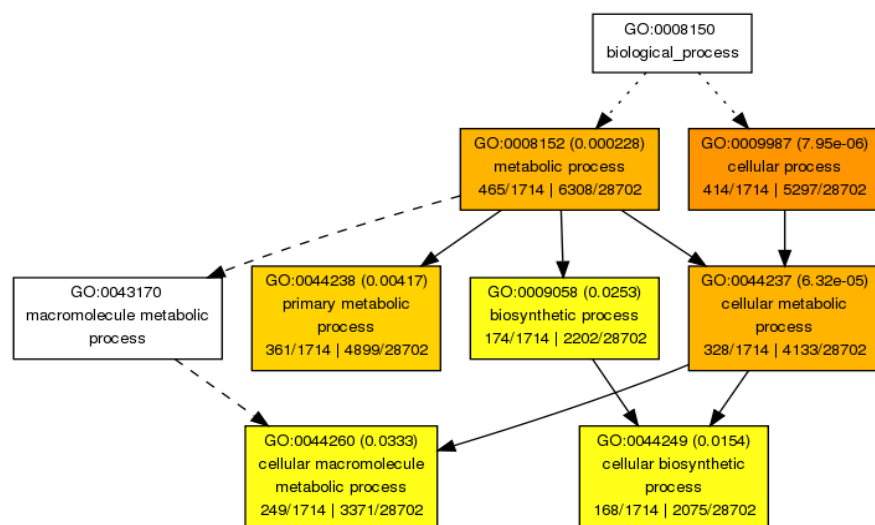
به منظور ساخت قطعات بزرگتر رونوشت به اصطلاح کانتینگ‌ها، همگذاری برای هر یک از نمونه‌ها به طور جداگانه توسط نرم‌افزار Trinity صورت گرفت (Grabherr et al. 2011). حداقل اندازه کانتینگ برای نمونه‌های کنترل و تنش ۲۰۰ نوکلئوتید در نظر گرفته شد. تعداد کانتینگ‌های بدست آمده برای دو نمونه کنترل و تنش به ترتیب ۴۸۵۶۲ و ۴۱۲۸۳ بود (جدول ۱). همچنین شاخص N50 به عنوان معیار کیفیت همگذاری برای هر نمونه محاسبه شد (Schliesky et al. 2012). این شاخص برای دو نمونه کنترل و تنش به ترتیب ۱۴۴۴ و ۱۵۵۸ نوکلئوتید بود (جدول ۱). اندازه N50 بدست آمده مطابق با گزارشات پیشین در سایر گیاهان از جمله *Brassica rapa* (۱۴۸۲) و *Zea mays* (۱۶۱۲) بود. تفسیر برای کانتینگ‌های بدست آمده توسط الگوریتم

¹ Transcript per million

² Domain

جدول ۱- جزئیات توالی‌یابی و همگذاری برای هر یک از نمونه‌های کنترل و تنش بافت تخمدان.

بافت تخمدان	تعداد Reads	درصد GC	تعداد کانتیگ	میزان N50	درصد تفسیر (Annotation)
کنترل	۶۹۶۳۲۴۶	۴۶	۴۸۵۶۲	۱۴۴۴	۹۳/۴۹
تنش سرما	۶۲۲۳۵۵۶	۴۵	۴۱۲۸۳	۱۵۵۸	۹۳/۱۶



شکل ۱- مسیرهای بیولوژیکی ژن‌های افزایش بیان یافته تحت تنش سرما در تخمدان بادام.

همچنین گزارش شده که LRR دُم‌ها عمدتاً در تنظیم برهمکنش درون مولکولی نقش دارند (McHale et al. 2006). نقش بسزای ترکیب دُم‌های کینازی و LRR و یا ترکیبات آن‌ها با سایر دُم‌ها در پروتئین‌های مختلف گیاهان در تحمل و پاسخ به سرما گزارش شده است. به عنوان مثال اخیراً Yang et al. (2014) گزارش کردند که بیان LRPK^۲ از طریق سرما القا می‌شود و فعالیت پروتئین کینازی Ser/Thr نشان می‌دهد. همچنین آن‌ها ثابت کردند که افزایش بیان این ژن در آرابیدوپسیس باعث افزایش تحمل به سرما می‌شود (Yang et al. 2014).

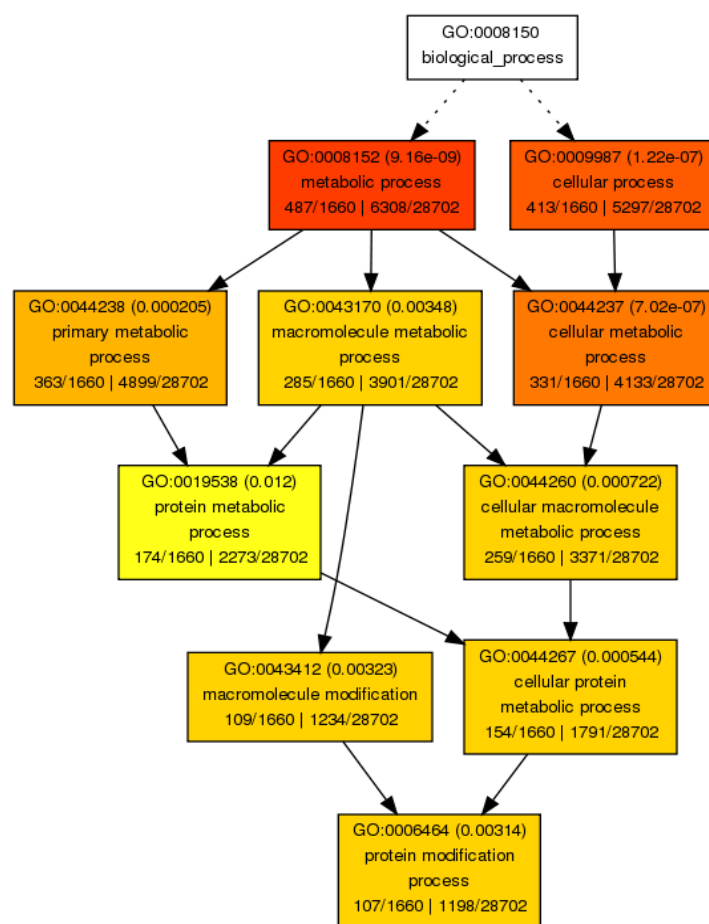
انواع دیگری از دُم‌های تشخیص داده شده شامل bZIP, Ap2, Endonuclease, Signal domain, Agglutinin, Phytochrome, Helicase_C, FKBP و Homeobox هستند (اشکال ۳ و ۴)، که بسیاری از آن‌ها در پاسخ به تنش سرما و سایر تنش‌ها نقش بسزایی دارند. گزارش شده که پروتئین‌های پاسخ به سرما CBF^۳ دُم متصل شونده به DNA شامل ERF و AP2 را کد می‌کنند.

متابولیک ماکرومولکول‌ها نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که اغلب این ژن‌ها دارای دُم کیناز و تکرارهای غنی از لوسین^۱ (LRR) هستند. همچنین بررسی دُم‌های کاهش بیان یافته فراوانی بالای دُم‌های کیناز و LRR را در ژن‌های درگیر در متابولیک ماکرومولکول‌ها، نشان داد (شکل ۴). دُم پروتئین کیناز یک دُم پروتئینی حفاظت شده بوده، که دارای عملکرد کاتالیزوری پروتئین کینازها است. پروتئین کینازها گروهی از آنزیم‌ها هستند، که گروه فسفات را به پروتئین‌ها طی عملی به نام فسفریلاسیون منتقل می‌کنند. این عمل کلید روشن و خاموش کردن بسیاری از فرایندهای سلولی همچون متابولیسم، رونویسی، پیشرفت چرخه سلولی، آپوپتوز و تمایز است (Hardie 2011; Wang et al. 2011). دُم LRR از ۱۹-۲۵ موتیف تکراری LRR تشکیل شده-اند، که هر کدام دارای ۲۹-۲۴ آمینواسید می‌باشند. هر LRR حاوی یک صفحه بتا و مارپیچ آلفا است که با یک حلقه به یکدیگر متصل شده‌اند (Akira et al. 2006). این دُم‌ها در برهمکنش بین پروتئین-پروتئین و یا لیگاند دخیل هستند.

^۲ Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase

^۳ C-repeat binding factors

^۱ Leucine-rich repeat



شکل ۲- مسیرهای بیولوژیکی ژن‌های کاهش بیان یافته تحت تنش سرما در تخمدان بادام.

بررسی ژن‌ها با بیشترین افزایش و کاهش بیان در بین انواع ژن-های تغییر بیان یافته در مسیر متابولیک ماکرومولکول‌ها نیز انجام شد. تعداد ۶ ژن با بیشترین تغییرات بیان (۳ ژن افزایش و ۳ ژن کاهش بیان یافته) به همراه میزان بیان ژن‌ها تحت تنش سرما در جدول ۲ نشان داده شده است.

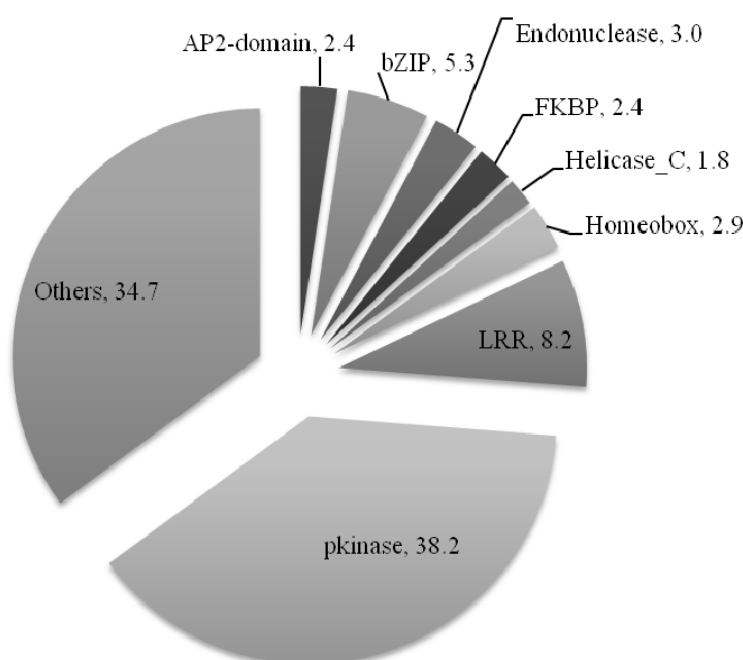
در بین ژن‌های افزایش بیان یافته دو ژن در دسته پروتئین‌های ریبوزومی 40S قرار دارند. زیر واحد 40S هدف بسیاری از فاکتورهای آغازگر ترجمه واقع می‌شود. ارتباط بین بسیاری از انواع پروتئین‌های ریبوزومی 40S در تحمل به تنش سرما و سرما سازگاری در مطالعات پیشین نشان شده است (Kim et al. 2004; Nakamura et al. 2005; Machida et al. 2008; Lang et al. 2013). با استفاده از تکنیک ریزآرایه القای بیان 40S ribosomal protein S13 را در گیاه برموگراس تحت تنش سرما

این پروتئین‌ها اختصاصاً با توالی DRE/CRT پیوند شده و رونویسی ژن‌هایی که با توالی DRE/CRT راه اندازی می‌شوند را فعال می‌سازند. بررسی پروموتور ژن *RD29A/COR78/* نشان داد که یک توالی محافظت شده به نام DRE، عنصر *cis* عمده برای تنظیم القا *RD29A* در پاسخ به دهیدراسیون و سرما است (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 1994). در پروموتور بسیاری از ژن‌های القا شونده توسط خشکی و سرما نیز یافت شده است (Shinozaki and Yamaguchi-2000). همچنین عناصر پاسخگر *cis* مشابهی به نام CRT¹ دارای موتیف A/GCCGAC هستند که در واقع مرکز توالی DRE را شکل می‌دهند و باعث تنظیم پروموتورهای القا شونده توسط سرما می‌شوند (Thomashow 1999).

¹ C-repeat

جدول ۲- ژن‌های مسیر متابولیک ماکرومولکول با بیشترین تغییرات بیان تحت تنش سرما در تخمدان بادام

نام ژن	شماره شناسه توالی در هلو	میزان بیان (Log ₂ Fold Change)
<i>40S ribosomal protein S16A</i>	ppa012996m	۱۵/۸۲
<i>NAC domain protein</i>	ppa008301m	۱۵/۱۱
<i>40S ribosomal protein S13</i>	ppa012862m	۱۴/۶۴
<i>receptor-like protein kinase HAIKU2-like</i>	ppa000895m	-۱۳/۳۱
<i>calcium-dependent protein kinase SK5</i>	ppa004580m	-۱۲/۰۶
<i>serine/threonine-protein kinase WNK8</i>	ppa002664m	-۱۱/۷۵

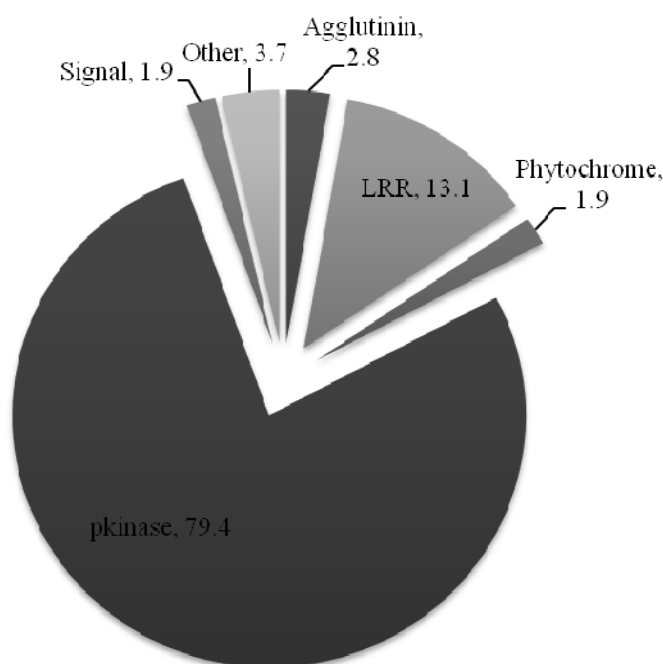


شکل ۳- انواع مختلف دمن ژن‌های افزایش بیان یافته دخیل در متابولیک ماکرومولکول‌ها.

پاسخ به تنش‌های غیرزیستی دارند. انواع مختلف پروتئین‌های NAC همچون NAC2 و NAC3 (Pinheiro et al. 2009)، NAC19 (Lin et al. 2007) و NAC23 (Nogueira et al. 2005) در پاسخ و تحمل به تنش سرما و تنش‌های زیستی گزارش شده‌اند. افزایش بیان این پروتئین‌ها در برنج و آرابیدوپسیس باعث افزایش تحمل این گیاهان شده است (Nakashima et al. 2012). بنابراین به نظر می‌رسد افزایش بیان این ژن در تخمدان بادام می‌تواند مرتبط با تحمل سرما در رقم H باشد.

نشان داده‌اند. افزایش بیان ژن‌های *40S ribosomal protein S13* و *40S ribosomal protein S16* در این مطالعه می‌تواند در تحمل به سرما در بادام نقش داشته باشد.

ژن دیگر در مسیر متابولیک ماکرومولکول‌ها با بیشترین بیان جز فاکتورهای رونویسی NAC قرار می‌گیرد. پروتئین‌های NAC انواعی از فاکتورهای رونویسی مختص گیاهان هستند. تاکنون بیش از ۱۰۰ نوع از این پروتئین‌ها در برنج و آرابیدوپسیس گزارش شده است (Nakashima et al. 2012). فاکتورهای رونویسی NAC نقش‌های متعددی نه تنها در توسعه گیاه بلکه در



شکل ۴- انواع مختلف ژن‌های کاهش بیان یافته دخیل در متابولیک ماکرومولکول‌ها.

است. همچنین گیرنده‌های شبه پروتئین کیناز^۳ در غشای پلاسمایی نقش مهمی را در دریافت پیام‌های خارجی ایفا می‌کنند (De Lorenzo et al. 2009; Wu and Zhou 2013). در هر حال هنوز اطلاعات کمی در رابطه با عملکرد و نقش آن‌ها در دریافت و انتقال پیام در تنش‌های غیر زیستی وجود دارد (Wu and Zhou 2013).

نتایج این آزمایش نشان داد که بررسی ترنسکرپتوم از طریق روش RNA-seq می‌تواند به خوبی برای شناسایی ژن‌ها و فرایندهای مهم درگیر در پاسخ به سرما بکار برده شود. نتایج این تحقیق به همراه مطالعات پیشین اهمیت فرایند متابولیک ماکرومولکول‌ها در پاسخ به سرما و تنش‌های محیطی دیگر را تایید می‌کند. نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که تغییر بیان ژن-های مختلف شامل انواع پروتئین کینازها، پروتئین‌های ریبوزومی و فاکتورهای رونویسی NAC با تحمل به سرما مرتبط بوده و حداقل برخی از این ژن‌ها می‌توانند به عنوان نشانگر برای شناسایی گیاهان متحمل و یا اهدفی برای دستورزی‌های ژنتیکی

در رابطه با ژن‌ها با بیشترین کاهش بیان، هر سه ژن بدست آمده انواعی از خانواده پروتئین کینازها می‌باشند. این نتایج با مطالعه حاضر در رابطه با ژن‌های کاهش بیان یافته (با بیش از ۷۹ درصد ژن کیناز شکل ۴) همخوانی دارد. تنش‌های شوری، خشکی و سرما سبب القا جریانی زودگذر از یون‌های کلسیم به درون سیتوپلاسم می‌شود (Sanders et al. 2002). امروزه ثابت شده که تنظیم فعالیت قسمت عمده‌ای از پروتئین کینازها بستگی به تغییر غلظت یون کلسیم دارد و این دسته را با نام اختصاری CDPK^۱ نامگذاری کرده‌اند. دسته دیگری از پروتئین کینازهای القا کننده تقسیمات میتوزی^۲ با نام اختصاری MAPK نیز مورد شناسایی قرار گرفته‌اند که تنظیم فعالیت آن‌ها بستگی به تغییر غلظت یون کلسیم داشته و در انتقال پیام از غشا سلولی به هسته نقش عمده‌ای دارند (Ramanjulu and Bartels 2002). کاهش بیان پروتئین کینازها همچون APS kinase در آرابیدوپسیس (Sasabe et al. 1997)، MAP65-1 (Takahashi et al. 1997) در توتون و MAPK (2006) در گردو تحت تنش‌های مختلف گزارش شده

^۱ Calcium-dependent protein kinase

^۲ Mitogen activated protein kinase

^۳ Receptor-like protein kinase

و سایر گیاهان خویشاوند آن برای تحمل به سرما و سایر تنش‌های غیرزیستی فراهم آورد.

سپاسگزاری

از دانشگاه شهرکرد برای فراهم نمودن بخشی از هزینه‌های این تحقیق کمال تشکر را داریم. همچنین از مرکز تحقیقات نهال و بذر کرج برای مساعدت و فراهم نمودن نمونه‌های گیاهی سپاسگزاریم.

منابع

- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
- Alizadeh-Salteh S, Arzani K, Imani A (2012) Self-incompatibility studies of some Iranian late-blooming almonds and pollen source effect on some characteristics of nuts. *Journal of Nuts* 2: 37-43.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
- Andrews S (2010) FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Reference Source.
- Barah P, Jayavelu ND, Rasmussen S, Nielsen HB, Mundy J, Bones AM (2013) Genome-scale cold stress response regulatory networks in ten *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *BMC Genomics* 14:722.
- Brown T, Mackey K, Du T (2001) Analysis of RNA by northern and slot blot hybridization. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc.
- Chen J, Song Y, Zhang H, Zhang D (2013) Genome-wide analysis of gene expression in response to drought stress in *Populus simonii*. *Plant Molecular Biology Reporter* 31:946-962.
- Chen J, Tian Q, Pang T, Jiang L, Wu R, Xia X, Yin W (2014a) Deep-sequencing transcriptome analysis of low temperature perception in a desert tree, *Populus euphratica*. *BMC Genomics* 15:326.
- Chen Y, Mao Y, Liu H, Yu F, Li S, Yin T (2014b) Transcriptome Analysis of Differentially Expressed Genes Relevant to Variegation in Peach Flowers. *PloS One* 9:e90842.
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science* 12:444-451.
- Cushman JC, Bohnert HJ (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology* 3:117-124.
- De Lorenzo L, Merchan F, Laporte P, Thompson R, Clarke J, Sousa C, Crespi M (2009) A novel plant leucine-rich repeat receptor kinase regulates the response of *Medicago truncatula* roots to salt stress. *Plant Cell* 21:668-680.

استفاده شوند. در هر حال به منظور بررسی بیشتر نیاز است که الگوی بیان ژن در ارقام حساس با ارقام متحمل مقایسه شود. به دلیل محدودیت زمانی و هزینه در این آزمایش تنها رقم متحمل H بررسی شد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که در مطالعات بعدی از ارقام حساس نیز استفاده شود. در مجموع از آنجا که تاکنون گزارشی مبنی بر بررسی وسیع ترنسکریپتوم در بادام در پاسخ به تنش‌های مختلف از جمله سرما صورت نگرفته، نتایج این تحقیق می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را برای انتخاب راهکار اصلاح بادام

- 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.
- Gordon A, Hannon G (2010) Fastx-toolkit. FASTQ/A short-reads pre-processing tools (unpublished) http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 29:644-652.
- Hardie D (2011) AMP-activated protein kinase-an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes and Development* 25:1895-1908.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6:986-994.
- Imani A, Mahamadkhani Y (2011) Characteristics of Almond Selections in Relation to Late Frost Spring. *International Journal of Nuts and Related Sciences* 2:31-34.
- Imani A, Ezaddost M, Asgari F, Masoumi S, Raeisi I (2012) Evaluation the Resistance of Almond to Frost in Controlled and Field Conditions. *International Journal of Nuts and Related Sciences* 3:29-36.
- Kakumanu A, Ambavaram MM, Klumas C, Krishnan A, Batlang U, Myers E, Grene R, Pereira A (2012) Effects of drought on gene expression in maize reproductive and leaf meristem tissue revealed by RNA-Seq. *Plant Physiology* 160:846-867.
- Kim KY, Park SW, Chung YS, Chung CH, Kim JI, Lee JH (2004) Molecular cloning of low-temperature-inducible ribosomal proteins from soybean. *Journal of Experimental Botany* 55:1153-1155.
- Lamp, BM, Connell JH, Duncan RA, Viveros M, Polito V (2001) Almond flower development: floral initiation and organogenesis. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126:689-696.
- Lang P, Zhang C-k, Ebel RC, Dane F, Dozier WA (2005) Identification of cold acclimated genes in leaves of *Citrus unshiu* by mRNA differential display. *Gene* 359:111-118.
- Li B, Dewey C (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12:323.

- Lin R, Zhao W, Meng X, Wang M, Peng Y (2007) Rice gene *OsNAC19* encodes a novel NAC-domain transcription factor and responds to infection by *Magnaporthe grisea*. *Plant Science* 172:120-130.
- Lu T, Lu G, Fan D, Zhu C, Li W, Zhao Q, Feng Q, Zhao Y, Guo Y, Li W (2010) Function annotation of the rice transcriptome at single-nucleotide resolution by RNA-seq. *Genome Research* 20:1238-1249.
- Machida T, Murase H, Kato E, Honjoh K-i, Matsumoto K, Miyamoto T, Iio M (2008) Isolation of cDNAs for hardening-induced genes from *Chlorella vulgaris* by suppression subtractive hybridization. *Plant Science* 175:238-246.
- McHale L, Tan X, Koehl P, Micheltmore RW (2006) Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biology* 7:212.
- Miranda C, Santesteban LG, Royo JB (2005) Variability in the relationship between frost temperature and injury level for some cultivated *Prunus* species. *Horticulture Science* 40:357-361.
- Mizuno H, Kawahara Y, Sakai H, Kanamori H, Wakimoto H, Yamagata H, Oono Y, Wu J, Ikawa H, Itoh T (2010) Massive parallel sequencing of mRNA in identification of unannotated salinity stress-inducible transcripts in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Genomics* 11:683.
- Mousavi S, Shiran B, Imani A, Houshmand S, Ebrahimie E (2014) Investigation of some physiological indices related to frost damage in almond cultivars with different flowering time. *Journal of Crop Production and Processing* 4: 235-247.
- Nakamura T, Yazaki J, Kishimoto N, Kikuchi S, Robertson AJ, Gusta LV, Ishikawa M (2013) Comparison of long-term up-regulated genes during induction of freezing tolerance by cold and ABA in bromegrass cell cultures revealed by microarray analyses. *Plant Growth Regulation* 71:113-136.
- Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012) NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1819:97-103.
- Nogueira FT, Schlögl PS, Camargo SR, Fernandez JH (2005) SsNAC23, a member of the NAC domain protein family, is associated with cold, herbivory and water stress in sugarcane. *Plant Science* 169:93-106.
- Pinheiro GL, Marques CS, Costa MD, Reis PA, Alves MS, Carvalho CM, Fietto LG, Fontes EP (2009) Complete inventory of soybean NAC transcription factors: sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response. *Gene* 444:10-23.
- Ramanjulu S, Bartels D (2002) Drought-and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell and Environment* 25:141-151.
- Rubio-Piña JA, Zapata-Pérez O (2011) Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 14:11-11.
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* 14: 401-417.
- Sasabe M, Soyano T, Takahashi Y, Sonobe S, Igarashi H, Itoh TJ, Hidaka M, Machida Y (2006) Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes and Development* 20:1004-1014.
- Scalabrin S, Policriti A, Nadalin F, Pinosio S, Cattonaro F, Vendramin E, Aramini V, Verde I, Bassi D, Pirona R (2011) A catalog of molecular diversity of *Prunus* germplasm gathered from aligning NGS reads to the peach reference sequence: bioinformatic approaches and challenges. XIII Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics 976: 169-176.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467-470.
- Schliesky S, Gowik U, Weber AP, Bräutigam A (2012) RNA-seq assembly—are we there yet? *Frontiers in Plant Science* 3:220.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 3:217-223.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 6:410-417.
- Socquet-Juglard D, Kamber T, Pothier JF, Christen D, Gessler C, Duffy B, Patocchi A (2013) Comparative RNA-Seq analysis of early-Infected peach leaves by the invasive phytopathogen *Xanthomonas arboricola* pv. Pruni. *PloS One* 8:e54196.
- Takahashi H, Yamazaki M, Sasakura N, Watanabe A, Leustek T, de Almeida Engler J, Engler G, Van Montagu M, Saito K (1997) Regulation of sulfur assimilation in higher plants: a sulfate transporter induced in sulfate-starved roots plays a central role in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94:11102-11107.
- Tarazona S, García-Alcalde F, Dopazo J, Ferrer A, Conesa A (2011) Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Research* 21:2213-2223.
- Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 50:571-599.
- Verde I, Abbott AG, Scalabrin S, Jung S, Shu S, Marroni F, Zhebentyayeva T, Dettori MT, Grimwood J, Cattonaro F (2013) The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nature Genetics* 45:487-494.
- Wang C, Jing R, Mao X, Chang, X, Li A (2011) TaABC1, a member of the activity of bc1 complex protein kinase family from common wheat, confers enhanced tolerance to abiotic stresses in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 62:1299-1311.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10:57-63.

Wu Y, Zhou JM (2013) Receptor-like kinases in plant innate immunity. *Journal of Integrative Plant Biology* 55:1271-1286.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 6:251-264.

Yang L, Wu K, Gao P, Liu X, Li G, Wu Z (2014) GsLRPK, a novel cold-activated leucine-rich repeat receptor-like protein kinase from *Glycine soja*, is a positive regulator to cold stress tolerance. *Plant Science* 215:19-28.