

آنالیز ترانسکریپتوم بافت برگ ارقام جو متفاوت در تشکیل زیست‌توده در مرحله زایشی

محمد رضا غفاری^{۱*}، نیکولاس فون ویرن^۲، کلاوس هامبک^۳، فلیپ فرانکن^۴

۱. دانشجوی دکتری، موسسه بیوشیمی و بیوتکنولوژی، دانشگاه هاله ویتنبرگ، هاله، آلمان.

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

۳. استاد، بخش تغذیه ملکولی، دانشگاه هاله ویتنبرگ، هاله، آلمان.

۴. استاد، موسسه بیوشیمی و بیوتکنولوژی، دانشگاه هاله ویتنبرگ، هاله، آلمان.

۵. استاد، بخش ریزازدیادی، موسسه گیاهان زینتی و سبزی صیفی، ایرفورت، آلمان.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۳۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۳/۲۷)

Transcriptome analysis of leaf tissue in contrasting lines of barley for biomass formation at the reproductive stage

Mohammad Reza Ghaffari^{1,2*}, Nicolaus von Wirén³, Klaus Humbeck⁴, Phillip Franken⁵

1. Ph.D. student, Institute for Biochemistry and Biotechnology, Martin Luther University of Halle-Wittenberg, Halle, Germany.

2. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

3. Molecular Plant Nutrition Group, Martin Luther University of Halle-Wittenberg, Halle, Germany.

4. Institute for Biochemistry and Biotechnology, Martin Luther University of Halle-Wittenberg, Halle, Germany.

5. Department Plant Propagation, Leibniz Institute of Vegetable and Ornamental Crops, Erfurt, Germany.

(Received: Jan. 19, 2016 - Accepted: Jun. 16, 2016)

Abstract

Deciphering of network correlation operating in the plant biomass accumulation and yield production is a pre-requisite for understanding the relationships between omics data and growth rate in plants. To investigate the relationship among transcripts and their regulation for lignocellulose biomass formation at the generative stage of barley, transcript profiling was applied on three contrasting spring barley lines two weeks after flowering. A custom barley cDNA Microarray (Agilent Technologies, Germany) containing 56000 barley oligonucleotides was used for transcriptome analysis on flag leaves of spring barley. The network correlation of transcripts involved in secondary and RNA metabolism revealed a higher number of positive than negative correlations, of which a signal molecule, ABH1-Cap binding protein showed the highest connectivity to other transcripts. Statistical test showed a strong positive interrelation between ABH1-Cap binding protein and a key gene of phenylpropanoid pathway, Cinnamoyl-CoA reductase. The integrated data suggested Cinnamoyl-CoA reductase (CCR) might be used as putative biomarker for engineering of lignocellulose biomass improvement at the generative stage in barley.

Keywords: Plant biomass, Transcriptome analysis, Network correlation analysis, Barley

چکیده

کشف همبستگی میان تجمع زیست‌توده در گیاه و عملکرد، پیش‌نیاز درک ارتباط بین داده‌های امیکس و میزان رشد در گیاهان است. برای جستجوی این ارتباط بین ترانسکریپت‌ها و نقش تنظیمی آنها در تشکیل زیست‌توده لیگنوسلولزی در فاز زایشی جو، پروفایل ترانسکریپت‌ها دو هفته پس از گلدهی در ۳ لاین جو بهاره مورد استفاده قرار گرفت. یک ریزآرایه سفارشی (custom microarray) متشکل از ۵۶۰۰۰ اولیگونوکلوئوتید برای آنالیز ترانسکریپتوم برگ پرچم در مرحله زایشی استفاده شد. شبکه‌ی همبستگی ترانسکریپت‌های درگیر در متابولیسم ثانویه و متابولیسم RNA، دارای تعداد بیشتری همبستگی مثبت نسبت به منفی بود که از این بین یک سیگنال ملکولی ABH1-Cap binding protein بالاترین میزان اتصال را به دیگر ترانسکریپت‌ها نشان داد. آنالیز آماری یک همبستگی مثبت بین ABH1-Cap binding protein و یک ژن کلیدی مسیر فنیل پروپانویید، به نام Cinnamoyl-CoA reductase نشان داد. تلفیق داده‌های بدست‌آمده پیشنهاد کننده‌ی این موضوع هستند که ژن (CCR) Cinnamoyl-CoA reductase ممکن است بتواند به‌عنوان بیومارکر برای مهندسی اصلاح زیست‌توده لیگنوسلولزی در فاز زایشی جو استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: زیست‌توده، آنالیز ترانسکریپتوم، شبکه همبستگی، جو

مقدمه

بر اساس گزارش سازمان خواربار جهانی (فائو) پیش بینی می‌شود که با افزایش جمعیت جهان به ۹ میلیارد نفر در سال ۲۰۵۰ میزان تقاضا برای غذا و انرژی دو برابر میزان فعلی باشد. برای رسیدن به این مقدار غذا و انرژی پاک، افزایش محصول در واحد سطح بدون افزایش سطح زیر کشت بهترین گزینه است. یکی از مهمترین راه‌ها برای رسیدن به این هدف بهینه‌سازی فرایندهای متابولیسم گیاهان برای ذخیره انرژی ثابت فتوسنتزی در قالب زیست‌توده گیاهی است. به عنوان مثال پیش‌بینی می‌شود نیمی از یک میلیارد تن زیست‌توده گیاهی غلات در ایالت متحده آمریکا برای تولید بیوانرژی استفاده شود (Perlack et al., 2011). سرعت رشد گیاهان به میزان فتوسنتز، تولید کربن آلی و اینکه چه میزان از کربن آلی و با چه کارایی تبدیل به زیست‌توده می‌شود وابسته است. زیست‌توده خروجی نهایی فعلی و انفعالات بین متابولیسم و برنامه‌های تنظیمی (که تخصیص مواد اولیه مورد نیاز رشد و توسعه گیاه را بین سلول‌ها و اندام‌های در حال رشد کنترل می‌کند) است. تجمع زیست‌توده در مرحله رشد رویشی نشان‌دهنده کارایی فعالیت‌های متابولیسمی است. این ارتباط بین متابولیسم و رشد گیاه در دو صورت امکان‌پذیر است: تجمع میزان بالایی از متابولیت‌ها باعث افزایش سرعت رشد می‌شود و یا اینکه کاهش متابولیت‌ها تا حداقل میزانی که به دیگر مکانیسم‌های حیاتی گیاه خللی وارد نشود نشانه افزایش در سرعت رشد بشمار می‌رود. گیاهان انواع متنوعی از متابولیت‌های اولیه و ثانویه از لحاظ ساختاری تولید می‌کنند که در رشد، بازسازی‌های سلولی و همچنین در مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی دخیل هستند. بنابراین هر گونه افزایش در میزان نرخ رشد می‌تواند با شدت تغییر در فرایندهای متابولیسمی وابسته همراه باشد.

به عبارت دیگر امکان شناسایی حالت‌های مختلف متابولیسمی مرتبط با رشد گیاه محتمل به نظر می‌رسد. در حال حاضر با کامل شدن ژنوم برخی گیاهان بررسی تغییرات در سطح بیان ژن‌ها به طور گسترده افزایش یافته است و راه را برای شناخت تغییرات در سطح ملکولی مانند واکنش اثر متقابل بین گیاهان و شرایط محیطی و همچنین اصلاح ملکولی گیاهان بر اساس شناسایی ژن‌های کاندیدا درگیر در صفات پیچیده فراهم ساخته است. به‌طور ساده می‌توان گفت که ایجاد یک پروفایل از ترانسکریپت‌ها یک جزء کلیدی در ژنومیکس عملکردی برای درک بهتر اثرات متقابل ژن‌ها و مسیرهای متابولیسمی فعال در فرایندهای زیستی است (Sreenivasulu et al., 2008). علاوه بر آن آنالیز ترانسکریپتوم یک راهکار ارزشمند برای کشف مسیرهای ملکولی و یا امضاءهای ترانسکریپتومی است که می‌تواند به عنوان یک بیومارکر در تحقیقات کشاورزی استفاده شود (Heidecker and Hare, 2007). جو به عنوان یکی از مهمترین غلات به سبب نقش آن در تامین غذای انسان و دام همواره مورد توجه بوده است. در سال‌های اخیر علاقه به استفاده از جو به علت فیبرهای محلول و نشاسته در بحث سلامت افزایش پیدا کرده است. جو یکی از منابع بتا گلوکان و سلنیوم است و نقش مهمی در کاهش کلسترول خون و افزایش آنتی‌اکسیدان دارد. اگر چه استفاده از دانه غلاتی مانند جو به عنوان سوخت زیستی بحث‌هایی را در مقابل استفاده از آن برای غذا ایجاد کرده است، با این حال این گیاه با ارزش در هر دو جنبه از پتانسیل کافی برخوردار است و مدل مناسبی برای استفاده در مطالعات مهندسی متابولیک ترکیبات لینگوسلولوزی است. همچنین سادگی ژنوم جو نسبت به غلات دیگر و در دسترس بودن توالی ژنوم آن اطلاعات ارزشمندی را در اختیار اصلاح‌گران ملکولی قرار داده تا از آن برای

انجام شده به منظور شناسایی بیومارکرهای مرتبط با افزایش زیست‌توده گیاهی در سطح متابولوم (Meyer *et al.*, 2007) و پروتوم (Sulpice *et al.*, 2009) بر روی گیاه مدل آرآیدوپسیس تالیانا است. بررسی جمعیت‌های طبیعی آرآیدوپسیس تالیانا در سطح متابولوم و پروتوم منجر به شناسایی نشاسته به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مهم در تولید زیست‌توده شد (Sulpice *et al.*, 2009). همچنین مطالعه ارتباط بین نیتروژن و کربن در یک جمعیت طبیعی از گیاه آرآیدوپسیس تیمار شده با مقدار بالا و پایین نیتروژن نشان داد که صفات متابولیکی مرتبط با زیست‌توده ارتباط نزدیکی با شرایط رشد گیاه دارد (Sulpice *et al.*, 2013). بررسی ارتباط بین متابولیت‌های اولیه و زیست‌توده با استفاده از آنالیزهای آماری چند متغیره در یک جمعیت متشکل از ۴۰۰ نمونه نشان داد که امضاء متابولیکی متشکل از ۴۴ متابولیت اولیه ارتباط معنی‌داری با میزان افزایش زیست‌توده دارد (Meyer *et al.*, 2007). بیشتر مطالعات انجام شده در سطح متابولوم و پروتوم بر نقش متابولیسم اولیه در تولید زیست‌توده بیشتر تاکید کرده است. مطالعه صورت گرفته در سطح ترانسکریپتوم ساقه یونجه نشان داد که ژن‌های درگیر در مسیر سنتز سلولز و لیگنین همبستگی بالایی با عوامل رونویسی دارند (Wang *et al.*, 2016). همچنین بررسی ترانسکریپتوم دو رقم نیشکر متفاوت از لحاظ میزان تولید لیگنین نشان داد که از ۲۰۰۰ ژن دارای تفاوت بیان ۲۱ ژن درگیر مسیر بیوستز لیگنین هستند. این مطالعه همچنین نشان داد که ژنوم‌های مختلف گیاهی دارای مقادیر متفاوتی از ژن‌های درگیر در مسیر بیوستز فنیل پروپانوید هستند. بررسی مقایسه بیان ژن‌ها در بافت‌ها و گیاهان متفاوت از لحاظ رشد و یا بافت‌های مختلف در حین تکامل اندام‌ها اطلاعات بیولوژیک مفیدی از فرایندهای زیستی در اختیار پژوهشگران قرار می‌دهد. در این پژوهش ترانسکریپتوم برگ در سه رقم جو متفاوت از لحاظ میزان زیست‌توده گیاهی دو هفته بعد از گلدهی مورد

مطالعه گیاهان دیگری که دارای پتانسیل تولید بیوانرژی هستند استفاده کنند.

بیشتر مطالعات انجام شده بر نقش مهم ترکیبات لیگنوسلولزی در افزایش زیست‌توده گیاهی قابل استفاده در سوخت‌های زیستی تاکید دارند. ترکیبات لیگنوسلولزی عمدتاً در دیواره‌های سلولی بافت‌های آوندی، و بافت‌های محافظ برگ و ساقه وجود دارند (Cass *et al.*, 2015). سلولز، همی سلولز و لیگنین دیواره‌های سلولی بعد از تجزیه با استفاده از واکنش‌های آنزیمی به قند تبدیل می‌شوند. ترکیبات لیگنینی برگ بعلاوه خاصیت هیدروفوبیکی امکان عبور املاح را میسر ساخته و مانع از دست رفتن آب گیاهان در طی فرایند تعریق و تعرق می‌شوند. اگرچه وجود لیگنین به عنوان یک سد دفاعی برای مقابله با تنش‌های زیستی و غیر زیستی ضروری است اما مشکلاتی را نیز برای استفاده از زیست‌توده‌های گیاهی در فرایندهایی مانند هضم توسط نشخوارکنندگان ایجاد کرده است. همچنین وجود لیگنین بالا در جو هضم آنزیمی ترکیبات لیگنوسلولزی را در فرایند تولید بیوانرژی ضروری کرده است. مونولینگوئیدهای سیناپیل^۱ کونیفریل^۲ و پارا-کوماریل الکل^۳ که در بافت دیواره سلولی به شکل اکسید شده متصل هستند و شکل‌های S، G و H لیگنین را ایجاد کرده‌اند توسط مسیر پروپانوید ساخته می‌شوند. در این مسیر ترکیبات متنوعی از فلاونوئیدها، لیگنین و کومارین‌ها ساخته می‌شود که در انتقال پیام (سیگنالینگ) و محافظت از گیاه در برابر تنش‌های محیطی مؤثر هستند (Naoumkina *et al.*, 2010). سازوکار بیوستز ترکیبات لیگنوسلولزی و تنظیم آن‌ها در گیاهان دولپه شناخته شده است در حالیکه این مسیر و تنظیم آن در گیاهان تک لپه هنوز به‌طور کامل مشخص نیست (Gray *et al.*, 2012). بیشتر مطالعات

1. Sinapyl
2. Conifer
3. P-Coumaryl alcohol

۵۶۰۰۰ اولیگونوکلوئوتید ساخته شده توسط شرکت Agilent بود. پروب‌های نشان‌دار شده با استفاده از یک بافر هیبریداسیون تجاری برای ۱۶ ساعت در دمای ۶۵ درجه با ریزآرایه دورگه‌سازی شدند. اسلایدها با استفاده از بافرهای شستشوی تجاری شرکت Agilent دو مرتبه هر کدام به مدت یک دقیقه شستشو شد. ارزیابی شدت فلورسانس Cy3 Agilent Microarray از استفاده از scanner انجام شد. نرم‌افزار FE ویرایش ۹٫۱ برای پردازش تصاویر ایجاد شده از اسکنر استفاده شد.

آنالیز داده‌های ترانسکریپتوم

از نرم‌افزار GeneSpring ویرایش ۱۱ شرکت Agilent برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. ابتدا داده‌ها بر اساس نوع ژنوتیپ و میزان زیست‌توده گیاهی گروه‌بندی شدند. نرمال‌سازی داده‌ها با استفاده از الگوریتم Quantile انجام شد. داده‌هایی با ضریب واریانس بیشتر از ۲۵ درصد حذف شدند. برای شناسایی ژن‌هایی که در بین ارقام مطالعه شده تفاوت بیان معنی‌دار داشتند از آنالیز واریانس یک طرفه در سطح معنی‌داری ۵ درصد استفاده شد. در آنالیز نهایی از P-value تصحیح شده در سطح کمتر از ۵ درصد ارایه شده توسط بنجامین-هوچبرگ استفاده شد (Benjamini and Hochberg, 1995). برای رسم نقشه حرارتی^۲، آنالیز شبکه همبستگی^۳ و مسیر بیوشیمیایی از نرم‌افزار Cytoscap ویرایش ۳ (Shannon *et al.*, 2003) استفاده شد. جهت بررسی‌های هستی‌شناسی^۴ (Gene ontology) از (Maere *et al.*, 2005) BINGO استفاده شد.

بررسی قرار گرفت. اطلس کامل بیان ژن‌ها در مسیر بیوستنز ترکیبات لیگنوسولوزی این سه رقم جو مقایسه شد تا در مطالعات افزایش زیست‌توده گیاهی برای تولید بیوانرژی استفاده شود.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی

سه رقم جو HOR216، HOR4555 و S241L107 که از نظر مقدار زیست‌توده گیاهی نهایی متفاوت هستند در این مطالعه استفاده شد. دو رقم HOR216 و HOR4555 توسط بانک ژن گیاهی آلمان و رقم S42IL107 توسط دانشگاه هاله آلمان اهدا شد. این ژنوتیپ‌ها برای صفات زراعی مانند وزن هزار دانه، ارتفاع و زیست‌توده گیاهی نهایی در سال‌های ۲۰۰۹ و ۲۰۱۰ در شرایط مزرعه‌ای ارزیابی شدند. بذرها پس از جوانه زنی در اتاقک رشد به مزرعه منتقل و طبق استانداردهای کشاورزی ایالت ساکسون-انهایت-موسسه تحقیقات ژنتیک کاربردی و اصلاح گیاهان زراعی (IPK) کشور آلمان-کشت شدند. برگ ارقام جو در سه تکرار دو هفته پس از گلدهی جمع‌آوری شد.

استخراج RNA و آنالیز ریزآرایه^۱

استخراج RNA از ۲۰۰ میلی‌گرم برگ با استفاده از تریزول مطابق پروتوکول شرکت سازنده انجام شد. برای خالص‌سازی RNA از کیت RNasy MinElute کمپانی QIAGEN استفاده شد. کمیت و کیفیت نمونه‌ها با استفاده از دستگاه Agilent bioanalyser 2000 ارزیابی شد. برای سنتز cDNA از کیت Affinityscript RT کمپانی Agilent استفاده شد. cDNAهای ساخته شده با استفاده از QIAGEN RNasyminispin column خالص‌سازی شدند. ریزآرایه مورد استفاده متشکل از

2. Heat map

3. Network correlation analysis

4. Gene Ontology

1. Microarray

نتایج و بحث

سرعت رشد گیاهان به سرعت جذب کربن و چگونگی تبدیل آن به زیست‌توده وابسته است. مطالعات زیادی در خصوص شناسایی مسیرهای متابولیکی و ژن‌های درگیر در تولید زیست‌توده در سطح ترانسکریپتوم و متابولوم گیاهان مدل مانند آراییدوپسیس تالیانا انجام شده است. با این حال به نظر می‌رسد نقش دیگر ژن‌های مؤثر در فرآیند توسعه‌ای گیاهان و ارتباط عوامل رونویسی با مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه که در تولید ترکیباتی مانند لیگنین نقش دارند در گیاهان زراعی مانند جو مورد غفلت واقع شده است. برای شناخت ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز ترکیبات لیگنوسولوزی و ارتباط آن‌ها با فاکتورهای رونویسی، سه رقم جو که از نظر مقدار زیست‌توده گیاهی نهایی متفاوت بودند در سطح ترانسکریپتوم بررسی شد. میزان زیست‌توده کل که یک شاخص برای میزان تجمع زیست‌توده گیاهی است در HOR4555، HOR216 و S42IL107 به ترتیب ۵۸/۷۲، ۸۸/۰۶ و ۲۰/۰۱ گرم بود.

شناسایی، تفسیر و طبقه‌بندی عملکردی ژن‌های افتراقی در برگ

تفسیر و طبقه‌بندی عملکردی ژن‌ها با آنالیز بلاست توالی‌های حاصل با آراییدوپسیس (www.arabidopsis.org) و برنج (<http://rice.plantbiology.msu.edu>) در پایگاه Uniprot (www.uniprot.org) با Cut of value برابر 10^{-10} منجر به شناسایی ۱۲۰۰۰ ژن شد. از این تعداد ۶۵۱۸ ژن به صورت احتمالی یک پروتیین را کد می‌کنند. بررسی آنالیزهای هستی‌شناسی^۱ نشان داد که سنتز هورمون‌ها و

متابولیسم چربی‌ها به ترتیب با ۱۳۰ و ۱۳۳ تک ژن^۲ و مسیر فتوسنتزی با ۸۱ تک ژن بیشترین بخش از ژن‌های شناسایی شده را به خود اختصاص داده‌اند (داده‌ها نشان داده نشده است). آنالیز هستی‌شناسی در سه سطح اجزای سلولی^۳، عملکرد ملکولی^۴ و فرایندهای زیستی^۵ نشان داد که Cell part و Organelle مرتبط با اجزای سلولی، Binding و catalytic activity به ترتیب مرتبط با عملکرد ملکولی و فرایندهای زیستی بیشترین درصد از ژن‌های enrich شده را به خود اختصاص داده‌اند (شکل ۱).

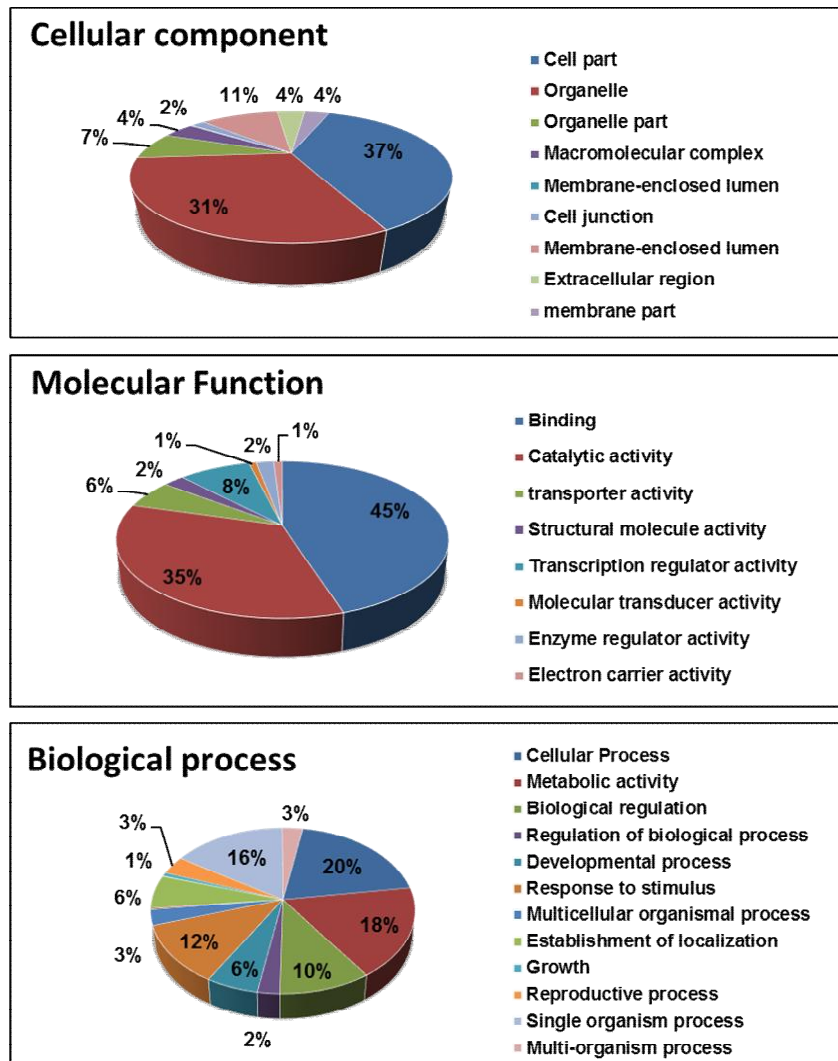
آنالیز تجزیه واریانس یک طرفه نشان داد ۳۲۱۱ و ۳۱۲۶ ژن به ترتیب در دو رقم HOR4555 و HOR216 نسبت به S42IL107 تفاوت بیان (بیش از ۱/۵ برابر) داشت. از این تعداد ۴۳۸ ژن در رقم HOR4555 و ۴۲۹ ژن در رقم HOR216 مربوط به متابولیسم RNA و متابولیسم ثانویه بود (شکل ۲). متابولیسم RNA در مجموع با ۵۷۹ ژن که به صورت معنی‌دار تغییر بیان داشت بیشترین سهم را در دو گروه مورد بررسی به خود اختصاص داد (شکل ۲). بررسی میزان بیان ژن‌ها در دو رقم HOR4555 و HOR216 نشان داد که ژن سینامیل-کوآ ردوکتاز یا CCR (Accession number: 35_3688)، مربوط به متابولیسم ثانویه بیشترین بیان (fold change= 8.2) Zinc finger family protein (Accession number: 35_1543) مرتبط با متابولیسم RNA کمترین میزان بیان (fold change<-8) را در هر دو رقم مورد بررسی داشتند (شکل ۲ B و C). بررسی ایزوفرم‌های مختلف از ژن CCR نشان داد که در هر دو رقم دارای زیست‌توده

2. Unigene
3. Cellular component
4. Molecular function
5. Biological process
6. Cinnamoyl-CoA reductase (CCR)

1. Gene ontology (GO)

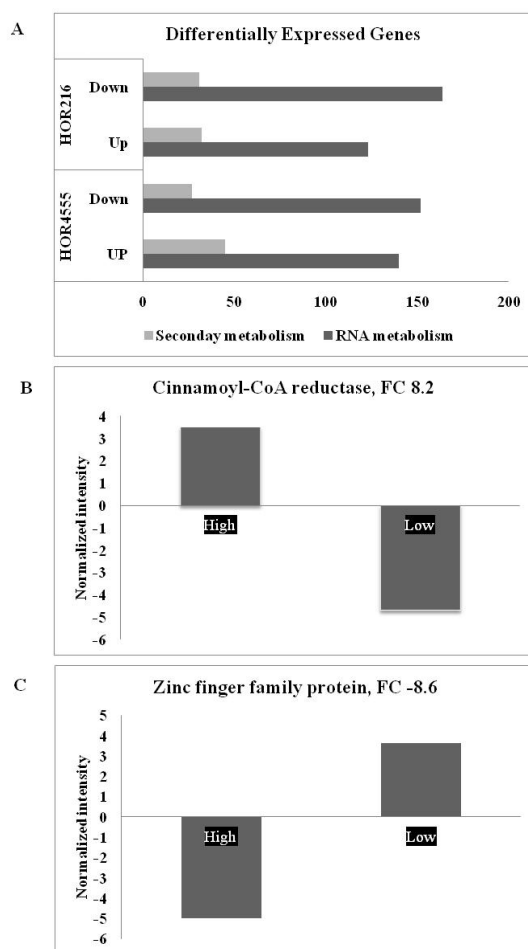
کاهش لیگنین می‌شود (Prashant *et al.*, 2011). همچنین در ذرت همبستگی معنی‌داری بین مواد اولیه واکنش آنزیم CCR با دوپامین که در شرایط تنش افزایش می‌یابد دیده شده است (Tamasloukht *et al.*, 2011). این نتایج نشان داد هر گونه تغییر در بیان ژن‌های مسیر بیوستت لیگنین، با تغییر در ژن‌های مرتبط با تنش همراه است.

گیاهی بالا و متوسط بیان این ژن به طور معنی‌دار بالاتر است. این ژن مهم‌ترین ژن مسیر متابولیکی بیوستت لیگنین است و تبدیل سینامیل کوآ استارازها^۱ را به سینامیل آلدئیدها^۲ (به‌عنوان اصلی ترین مرحله در مسیر بیوستت مونومرهای لیگنین) تسهیل می‌کند (Lacombe *et al.*, 1997). اخیراً گزارش شده کاهش بیان ژن CCR در صنوبر و تنباکو موجب



شکل ۱. بررسی هستی‌شناسی بین گروه‌های کارکردی عملکردهای مولکولی، فرایندهای زیستی و اجزای داخلی سلول. تفسیر ژن‌ها با آنالیز بلاست توالی‌های حاصل با آرآبیدوپسیس (www.arabidopsis.org) و برنج (<http://rice.plantbiology.msu.edu>) در پایگاه Uniprot (www.uniprot.org) با Cut of value برابر 10^{-10} انجام شد. سپس برای بررسی هستی‌شناسی از نرم افزار BINGO استفاده شد. رنگ‌های آبی و قرمز بیشترین درصد از ژن‌های اختصاص داده به هر گروه کارکردی را نشان می‌دهد.

1. Cinnamoyl-CoA estrase
2. Cinnamaldehyde



شکل ۲. ژن‌های دارای بیان افتراقی دخیل در متابولیسم ثانویه و متابولیسم RNA در دو رقم با زیست‌توده بالا و متوسط. نمودار تعداد ژن‌های بیان شده در سطح ۵ درصد و با fold change بالاتر از ۱/۵ را نشان می‌دهد. شکل‌های B و C بیشترین و کم‌ترین بیان را در ژن‌های افتراقی نشان می‌دهد (FC=Fold change).

بین ژن‌های ۴-کوماریت کوآ لیگاز^۱، کافوئیل کوآ-۳-متیل ترانسفراز^۲، سینامیل الکل دی هیدروژناز^۳، سینامیل کوآ رودوکتاز و فنیل آلانین آمونیا لیاز^۴ به‌طور مشترک در هر دو رقم HOR216 و HOR4555 به صورت معنی‌داری enrich شدند. از بین ژن‌های enrich شده و درگیر در مسیر بیوستنز لیگنین بیان ایزوفرم‌های مختلف ژن‌های سینامیل الکل دی هیدروژناز سینامیل کوآ رودوکتاز و فنیل آلانین آمونیا

GSEA یا Gene set enrichment analysis

ژن‌های افتراقی

آنالیز ژن‌های دارای بیان افتراقی در دو رقم با زیست‌توده بالا و متوسط با استفاده از GSEA منجر به گروه‌بندی ژن‌های enrich شده در ۵۶ گروه عملکرد زیستی شد. از بین ژن‌هایی که در متابولیسم ثانویه درگیر هستند به ترتیب ۲۸ و ۱۸ ژن در دو رقم HOR216 و HOR4555 در متابولیسم ترکیبات لیگنینی و فلاونوئیدها نقش داشتند (شکل ۳). از این

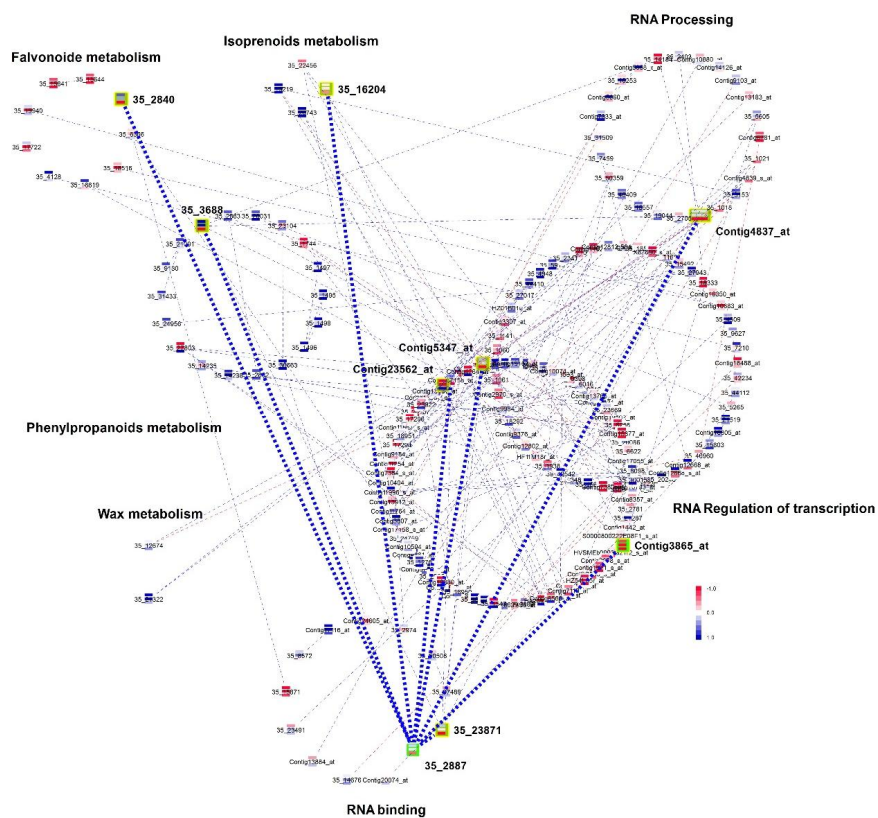
1. 4-Coumarate CoA ligase (4CL)
2. Caffeoyl-CoA o-methyltransferase (CCoAOMT)
3. Cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD)
4. Phenylalanine ammonia lyase (PAL)

متیل ترانسفراز در دو رقم جو احتمالاً نشان می‌دهد که بیوستنز ترکیبات لیگنینی ممکن است از مسیر تبدیل پارا-کوماریل کوآ و بیشتر توسط آنزیم CCR انجام شود (Riedelsheimer *et al.*, 2012). این نتیجه همچنین بر مهندسی ژنتیک این ژن جهت کاهش مونومرهای لیگنین و افزایش تبدیل ترکیبات سلولوزی به لیگنینی در بافت‌های گیاهی خانواده گرامینه برای تولید بیوانژری تاکید می‌کند (Zhong *et al.*, 2000).

لیاز به‌طور معنی‌داری در رقم جو با زیست‌توده بالا افزایش بیان را نشان دادند (شکل ۵). درحالی‌که ژن کافوئیل کوآ-۳-متیل ترانسفراز در هر دو رقم زیست‌توده گیاهی بالا و متوسط نسبت به رقم زیست‌توده گیاهی کم کاهش بیان داشت (شکل ۵). کافوئیل کوآ-۳-متیل ترانسفراز از ژن‌های کلیدی مسیر بیوستنز لیگنین گیاهان چوبی است. کاهش بیان این ژن در گیاه صنوبر منجر به کاهش لیگنین می‌شود (Zhong *et al.*, 2000). کاهش بیان کافوئیل کوآ-۳-

Description	HOR216	HOR4555
Biological Regulation	90	89
Cellular response to chemical stimulus	19	16
Cellular response to endogenous stimulus	14	12
Cellular response to organic substance	18	16
Cellular response to stimulus	23	22
Developmental process	41	44
Multicellular organismal development	38	39
Multicellular organismal process	40	41
Negative Regulation of biological process	18	22
Negative Regulation of metabolic process	11	14
Phenylpropanoid biosynthetic process	13	8
Phenylpropanoid metabolic process	15	10
Regulation of biological process	90	88
Regulation of biosynthetic process	70	70
Regulation of cellular biosynthetic process	70	70
Regulation of cellular metabolic process	73	72
Regulation of cellular process	80	77
Regulation of gene expression	74	77
Regulation of gene expression, epigenetic	10	12
Regulation of macromolecule biosynthetic process	67	68
Regulation of macromolecule metabolic process	76	79
Regulation of metabolic process	82	83
Regulation of nitrogen compound metabolic process	66	66
Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	66	66
Regulation of primary metabolic process	72	72
Regulation of RNA metabolic process	39	38
Regulation of transcription	65	65
Regulation of transcription, DNA-dependent	39	38
Response to chemical stimulus	46	47
Response to endogenous stimulus	28	31
Response to hormone stimulus	23	28
Response to organic substance	38	38
Response to stimulus	64	67
Secondary metabolic process	18	14
Transcription	12	10
Aromatic compound biosynthetic process	13	
Cellular amino acid derivative biosynthetic process	13	
Cellular amino acid derivative metabolic process	15	
Cellular aromatic compound metabolic process	15	
Cellular nitrogen compound metabolic process	33	
Small molecule biosynthetic process	20	
Small molecule metabolic process	33	
RNA metabolic process	18	
Nitrogen compound metabolic process	35	
Nucleic acid metabolic process	27	
Nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	29	
Post-embryonic development		24
Posttranscriptional Regulation of gene expression		9
Negative Regulation of cellular process		13
Negative Regulation of gene expression		12
Negative Regulation of macromolecule metabolic process		13
Gene silencing		9
Gibberellic acid mediated signaling pathway		5
Isoprenoid biosynthetic process		9
Isoprenoid metabolic process		10
Cellular response to gibberellin stimulus		5

شکل ۳. مشخصات ژن‌های افتراقی enrich شده در دو رقم جو با زیست‌توده بالا و متوسط نسبت به زیست‌توده کم با استفاده از نرم‌افزار BINGO. ژن‌ها با p-value های کمتر از ۵ درصد بنجامین-هوچبرگ به عنوان enrich انتخاب شدند. رنگ قرمز متعلق به بیشترین و سیاه به کمترین تعداد از ژن‌های enrich شده مرتبط با فرایندهای زیستی است.



شکل ۴. شبکه همبستگی بین ترانسکریپت‌های متابولیسم RNA و متابولیسم ثانویه در سه رقم جو متفاوت از نظر زیست‌توده. یال‌های آبی اتصال مثبت و قرمز اتصال منفی را برای $r\text{-value} > 0.90$ نشان می‌دهند. یال‌های ضخیم‌تر تعداد اتصالات ژن ABH1-Cap binding protein را با ۸ اتصال در شبکه همبستگی نشان می‌دهد.

همبستگی منفی بود (شکل ۴). ژن رمزکننده Accession) ABH1-Cap binding protein (number: 35_2887) بیشترین اتصال ($n=8$) را در بین ژن‌ها بخود اختصاص داد و به نظر می‌رسد با ایجاد این هاب نقش تنظیمی برای دیگر ژن‌های موجود در شبکه همبستگی دارد. این ژن همچنین دارای همبستگی قوی و معنی‌دار با ۴ ژن درگیر در بیوسنتز ترکیبات ثانویه شامل چالکون سنتاز، ایزوپنتیل دی فسفات ایزومراز، سینامیل کوآ ردوکتاز و سیانت هیدراتاز است (شکل ۴). گزارش شده که ABH1 در انتقال پیام به واسطه هورمون آبسزیک

جهت شناسایی ژن(ها)یی که نقش احتمالی تنظیمی در دو گروه مورد بررسی دارند از آنالیز شبکه همبستگی^۱ استفاده شد. شکل ۴ آنالیز شبکه همبستگی با استفاده از ضریب پیرسون را نشان می‌دهد. یال‌های آبی^۲ و قرمز به ترتیب همبستگی مثبت و منفی با P-value کوچکتر از $10E-05$ هستند. گره‌ها^۳ میزان بیان ژن‌ها را در هر سه رقم جو نشان می‌دهد. از تعداد ۲۲۹ اتصال تنها ۴۶ اتصال بین ژن‌های درگیر در متابولیسم ثانویه و ژن‌های متابولیسم RNA بود. همچنین از مجموع ۲۲۹ اتصال ۱۹۷ مورد همبستگی مثبت و ۳۲ مورد

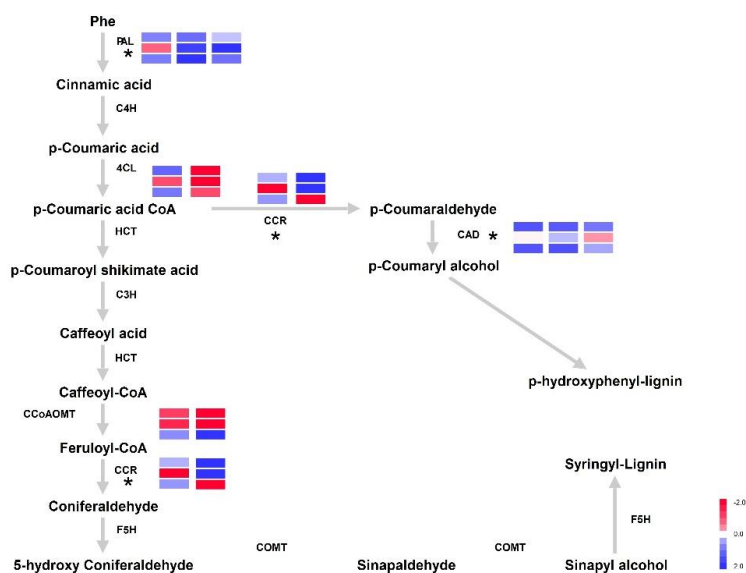
4. Hub
5. Chalcone synthase
6. Isopentenyl diphosphate isomerase
7. Cyanate hydratase

1. Network correlation analysis
2. Edges
3. Nodes

مراحل تولید سوخت‌های زیستی است. برای تولید بیوانرژی استفاده از زیست‌توده‌هایی با میزان بالای سلولز به علت نیاز کمتر به هضم‌های آنزیمی و شیمیایی در مقایسه با ترکیباتی با لیگنین بیشتر مقرون به صرفه‌تر است. همبستگی بین ژن کلیدی مسیر بیوستز لیگنین و مهمترین ژن شبکه همبستگی در بین سه رقم جو که از نظر میزان تشکیل زیست‌توده متفاوت هستند این فرضیه را تقویت می‌کند که هرگونه تغییر در میزان بیان ژن رمزکننده ABH1-Cap binding protein می‌تواند بر درصد تشکیل مونومرهای لیگنین نیز تاثیرگذار باشد. علاوه بر این ژن رمزکننده آنزیم چالکون ایزومراز (Accession number: 35_2480) نیز همبستگی مثبت و معنی‌داری با ABH1-Cap binding protein داشت. چالکون ایزومراز آنزیم کلیدی شروع بیوستز فلاونوئیدها است (Shinya *et al.*, 2016). این آنزیم تبدیل ۱-چالکون^۱ به ۱-فلاون^۲ را تسریع می‌کند. در واقع فعالیت آنزیم چالکون ایزومراز به همراه آنزیم چالکون سنتاز تشکیل حلقه در ساختار فلاونوئیدها را تسهیل می‌کند. نتایج نشان داد که بیان ایزوفرم‌های ژن چالکون ایزومراز در دو رقم زیست‌توده گیاهی بالا و متوسط نسبت به رقم جو با زیست‌توده گیاهی کم به طور معنی‌دار مثبت بود. در صورتیکه در رقم دارای زیست‌توده گیاهی بالا ایزوفرم مشابه با WHP1 Chalcone synthase دارای بیان منفی و معنی‌دار بود. اگرچه هم‌بیانی^۳ دو ژن چالکون ایزومراز و چالکون سنتاز قبلاً گزارش شده بود (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2008) با این حال تفاوت بیان ایزوفرم‌هایی از این دو ژن نشان داد که شار بیوستز فلاونوئیدها برای ساختن ترکیباتی که در تشکیل رنگدانه مانند انتوسیانین‌ها مؤثر هستند با بیوستز لیگنین ممکن است تفاوت داشته باشد (Shinya *et al.*, 2016).

اسید نقش اساسی دارد (Hugouvieux *et al.*, 2001). هورمون آبسزیک اسید یکی از مهمترین هورمون‌های گیاهی دخیل در تنظیم پاسخ گیاه به تنش‌های غیر زیستی و توسعه رشد و نمو است. این هورمون همچنین دارای نقش مهمی در رسیدگی دانه، جوانه زنی بذر و تطبیق گیاه با تنش‌های غیرمحیطی است (Leung and Giraudat, 1998). اخیراً نقش این هورمون در فعال سازی آنزیم فینیل آمونیا لیاژ تحت تنش کادمیوم و افزایش بیوستز لیگنین در گندم گزارش شده است (Shakirova *et al.*, 2016). اگرچه تاکنون بیشتر نقش عوامل رونویسی مانند خانواده MYB در کنترل ژن‌های دخیل در بیوستز مونومرهای لیگنین مورد مطالعه قرار گرفته است (Zhao and Dixon, 2011) با اینحال مطالعات تکمیلی نشان داد که گونه گیاه و مرحله رشدی آن تاثیر زیادی در نوع همبستگی فاکتورهای رونویسی مختلف با فرایند بیوستز مونومرهای لیگنین دارد (Wang *et al.*, 2016). در این مطالعه بررسی شبکه هم بیانی این ژن نشان داد که ABH1 هم بیانی معنی‌داری با فاکتورهای رونویسی دخیل در تنظیم فرایند بیوستز لیگنین مانند ژن‌های MYBها دارد (داده‌ها نشان داده نشده است). آنالیز شبکه همبستگی همچنین نشان داد که یک همبستگی مثبت و معنی‌دار ($p\text{Value} < 10E^{-}$) بین ژن رمزکننده ABH1 و مهمترین ژن رمزکننده آنزیم در میسیر بیوستز لیگنین سینامیل کوآ ردوکتاز وجود دارد. همانطور که اشاره شد از بین ژن‌های افتراقی ژن CCR بیشترین بیان مثبت را داشت. اخیراً گزارش شده که جهش در ژن CCR ذرت موجب ۳۱٪ کاهش در مونومرهای لیگنین می‌شود (Tamasloukht *et al.*, 2011). کاهش بیان ژن CCR در تنباکو نیز سبب کاهش بیوستز لیگنین و کاهش سرعت رشد در گیاه شده است (Yoon *et al.*, 2015). مهندسی متابولیک با تغییر میزان بیوستز لیگنین به سلولز یکی از مهمترین

1. a chalcone
2. a flavon
3. Coexpression



شکل ۵. یک نمای شماتیک از ژن‌های مسیر پروپانویید. رنگ آبی و قرمز به ترتیب بیان مثبت و منفی را نشان می‌دهند. از بین ژن‌های enrich شده مسیر بیوستنز لیگنین بیان ایزوفرم‌های مختلف ژن‌های سینامیل الکل دی هیدروژناژ سینامیل کوآ رودوکتاز و فنیل آلانین آمونیا لیاز به‌طور معنی داری در رقم جو با زیست‌توده بالا افزایش بیان را نشان دادند. ژن کافوئیل کوآ-۳-متیل ترانسفراز در هر دو رقم زیست‌توده گیاهی بالا و متوسط نسبت به رقم زیست‌توده گیاهی کم کاهش بیان داشت. علامت ستاره بیان ژن‌های enrich شده را نشان می‌دهد.

ژن‌های مسیر پروپانویید ژن PAL، CCR1 و CCoAOMT با بیشترین میزان بیان و ژن CAD با کمترین میزان بیان می‌تواند نشانگرهای مناسبی برای مهندسی ساختار لیگنین و تغییر نسبت ترکیبات لیگنوسولوزی در جو و دیگر گیاهان زراعی باشند.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مؤسسه تحقیقات ژنتیک کاربردی و اصلاح گیاهان زراعی (IPK) کشور آلمان به‌جهت تامین هزینه مالی این تحقیق تقدیر و تشکر می‌گردد.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه نقش بیان ژن‌های درگیر در متابولیسم RNA و متابولیسم ثانویه و همچنین شبکه همبستگی میان این ژن‌ها در سه رقم جو دارای زیست‌توده گیاهی بالا (HOR216)، زیست‌توده گیاهی متوسط (HOR4555) و زیست‌توده گیاهی کم (S42IL107) بررسی شد. شکل ۵ یک مدل شماتیک از یک امضای ترانسکریپتومی برای ژن‌های دخیل در بیوستنز لیگنین گیاه جو را نشان می‌دهد. در این شکل از رنگ آبی برای افزایش بیان و رنگ قرمز برای کاهش بیان استفاده شده است. از میان

REFERENCES

- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the royal statistical society. J. R. Statist. Soc. B.* 57: 289-300.
- Cass CL, Peraldi A, Dowd P.F, Mottia Y, Santoro N, Karlen SD, Bukhman YV, Foster CE, Throrer N, Bruno LC (2015) Effects of phenylalanine ammonia lyase (PAL) knockdown on cell wall composition, biomass digestibility, and biotic and abiotic stress responses in *Brachypodium*. *J. Exp. Bot.* 60: 4317-4335.
- Gray J, Caparrós-Ruiz D, Grotewold E

- (2012) Grass phenylpropanoids: regulate before using! *Plant Sci.* 184:112-120.
- Heidecker B, Hare JM (2007) The use of transcriptomic biomarkers for personalized medicine. *Heart Fai. Rev.* 12: 1-11.
- Hugouvieux V, Kwak J.M, Schroeder J.I (2001). An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Cell.* 106: 477-487.
- Lacombe E, Hawkins S, Doorselaere J, Piquemal J, Goffner D, Poeydomenge O, Boudet A.M, Grima-Pettenati J (1997) Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. *Plant J.* 11: 429-441.
- Leung J, and Giraudat J (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 49:199-222.
- Maere S, Heymans K, Kuiper M (2005) BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics.* 21:3448-3449.
- Meyer RC, Steinfath M, Lisek J, Becher M, Witucka-Wall H, Törjék O, Fiehn O, Eckardt Ä, Willmitzer L, Selbig J (2007) The metabolic signature related to high plant growth rate in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:4759-4764.
- Naoumkina MA, Zhao Q, Gallego-Giraldo L, Dai X, Zhao PX, Dixon RA (2010) Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. *Mol. Plant. Pathol.* 11:829-846.
- Perlack RD, Eaton LM, Turhollow Jr, Langholtz AF, Brandt MH, Downing CC, Graham ME, Wright LE, Kavkewitz LL, Shamey AM (2011) US billion-ton update: biomass supply for a bioenergy and bioproducts industry.
- Prashant S, Sunita, MS, Pramod S, Gupta RK, Kumar SA, Karumanchi SR, Rawal S, Kishor PK (2011) Down-regulation of *Leucaena leucocephala* cinnamoyl CoA reductase (LICCR) gene induces significant changes in phenotype, soluble phenolic pools and lignin in transgenic tobacco. *Plant Cell Reports.* 30: 2215-2231.
- Riedelsheimer C, Lisek J, Czedik-Eysenberg A, Sulpice R, Flis A, Grieder C, Altmann T, Stitt M, Willmitzer L, Melchinger AE (2011) Genome-wide association mapping of leaf metabolic profiles for dissecting complex traits in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109:8872-8877.
- Shakirova F, Allagulova CR, Maslennikova D, Klyuchnikova E, Avalbaev A, Bezrukova M (2016) Salicylic acid-induced protection against cadmium toxicity in wheat plants. *Environ. Exper. Bot.* 122: 19-28.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome. Res.* 13: 2498-2504.
- Shinya T, Iwata E, Nakahama K, Fukuda Y, Hayashi K, Nanto K, Rosa AC, Kawaoka A (2016) Transcriptional Profiles of Hybrid *Eucalyptus* Genotypes with Contrasting Lignin Content Reveal That Monolignol Biosynthesis-related Genes Regulate Wood Composition. *Front. Plant. Sci.* 7: 443.
- Sreenivasulu N, Usadel B, Winter A, Radchuk V, Scholz U, Stein N, Weschke W, Strickert M, Close TJ, Stitt M (2008) Barley grain maturation and germination: metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new MapMan/PageMan profiling tools. *Plant. Physiol.* 14: 1738-1758.
- Sulpice R, Nikoloski Z, Tschöep H, Antonio C, Kleessen S, Larhlimi A, Selbig J, Ishihara H, Gibon Y, Fernie

- AR (2013) Impact of the carbon and nitrogen supply on relationships and connectivity between metabolism and biomass in a broad panel of Arabidopsis accessions. *Plant physiol.* 162: 347-363.
- Sulpice R, Pyl ET, Ishihara H, Trenkamp S, Steinfath M, Witucka-Wall H, Gibon Y, Usadel B, Poree F, Piques MC (2009) Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:10348-10353.
- Tamasloukht B, Lam MSJWQ, Martinez Y, Tozo K, Barbier O, Jourda C, Jauneau A, Borderies G, Balzergue S, Renou JP (2011) Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase 1 (CCR1) mutant in maize: effects on lignification, fibre development, and global gene expression. *J. Exp. Bot.* 62: 3837-3848.
- Wang H, Yang JH, Chen F, Torres-Jerez I, Tang Y, Wang M, Du Q, Cheng X, Wen J, Dixon R (2016) Transcriptome analysis of secondary cell wall development in *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* 17:23.
- Yonekura-Sakakibara K, Tohge T, Matsuda F, Nakabayashi R, Takayama H, Niida R, Watanabe-Takahashi, A., Inoue, E., and Saito, K. (2008). Comprehensive flavonol profiling and transcriptome coexpression analysis leading to decoding gene-metabolite correlations in Arabidopsis. *The Plant Cell* 20: 2160-2176.
- Yoon J, Choi H, An G (2015) Roles of lignin biosynthesis and regulatory genes in plant development. *J. Integr. Plant Biol.* 57: 902-912.
- Zhao Q, Dixon RA (2011) Transcriptional networks for lignin biosynthesis: more complex than we thought? *Trends Plant. Sci.* 16: 227-233.
- Zhong R, Morrison WH, Himmelsbach DS, Poole FL, Ye ZH (2000) Essential role of caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants. *Plant Physiol.* 124: 563-578.