مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال هفتم، شماره نوزدهم، پائیز ۱۳۹۶ (۷۶-۶۵)

Crop Biotech.
Autumn (2017) 18: 65-76.

معرفی ژن‌های امید بخش دخیل در تحمل به تنش شوری در برنج بر اساس آنالیز داده‌های ریزآرایه

شهربانو میردارمنصوری[۱]، نادعلی بابائیان جلودار[۲*]، زهراسادات شبّر[۳]، قربانعلی نعمت‌زاده[۲]، محمدرضا غفاری[۳]

۱. دانشجوی دکتری مهندسی ژنتیک و ژنتیک مولکولی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

۲. استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

۳. استادیار گروه زیست‌شناسی سیستم‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۲۰- تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۸/۲۵)

Introducing the promising salt tolerance involved genes in rice based on the microarray data analysis

Shahrbano Mirdar Mansuri[1], Nadali Babaeian Jelodar[2*], Zahra-Sadat Shobbar, Ghorbanali Nematzadeh[2], Mohammad Raza Ghaffari[3]

1. Ph.D. Student of Genetic Engineering and Molecular Genetic, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, Iran
2. Professor, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, Iran
3. Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

(Received: Sep. 11, 2017 - Accepted: Nov. 16, 2017)

چکیده

برنج یک گیاه گلیکوفیت است و شوری خاک یکی از مهمترین محدودکننده‌های تولید برنج می‌باشد. از آنجایی که دستیابی به برنج متحمل به تنش شوری نیازمند درک سازوکار پیچیده پاسخگویی به تنش است، در این تحقیق تلاش شده تا با آنالیز داده‌های تولید شده از طریق فناوری ریزآرایه، ژن‌های مهم پاسخگو به تنش شوری شناسایی شوند. بدین منظور نه سری داده ریزآرایه مورد آنالیز قرار گرفتند و تعداد ۱۳۷۹۸ ژن، دو برابر تغییر بیان معنی‌دار نسبت به شرایط نرمال نشان دادند. نتایج هستی شناسی ژن‌هایی که در ارقام متحمل دارای افزایش بیان شده بودند، نشان داد که در بخش فرآیندهای زیستی و عملکرد مولکولی بیشتر ژن‌ها در دسته رونویسی نسبت به زمینه ژنتیکی برنج به طور معنی‌داری غنی شدند. در آنالیز هاب مشخص شد که بیشتر ژن های کلیدی از دسته پروتئین کینازها هستند، *PFK* و *CPK10* از جمله مهمترین کینازهای قطب شناسایی شده می باشند. درمیان عوامل رونویسی، *GCN5* به عنوان ژن کلیدی در آنالیز هاب شناسایی شد. در کل، نتایج آنالیز هاب ۱۰ ژن کلیدی را شناسایی نمود که از دسته عوامل تنظیمی، ترانسپورترها و سیگنال ترارسانی بودند. انتظار می‌رود نتایج بدست آمده در جهت تحقق دست‌یابی به برنج متحمل به تنش شوری مورد استفاده واقع شود.

واژه کلیدی: برنج، تنش شوری، داده‌های ریزآرایه، آنالیز هاب، هستی‌شناسی.

Abstract

Rice is a glycophyte plant and salinity stress is one of the most important obstacles for the rice production. Understanding complex molecular mechanisms of plant response to salt stress is necessary for developing salt tolerant rice. In this study, microarray data analysis was used for identification of salt stress responsive genes. By analysis of 9 microarray data sets, 13798 differentially expressed genes were found. Gene ontology analysis of up-regulated genes in the salt tolerant genotypes showed that transcription factors enriched against rice genetic background. Based on the hub analysis results, most of the key genes were protein kinases, for example CPK10 and PFK. Amongst the transcription factors, GCN5 identified as the key gene in the hub analysis in this study. Totally, 10 hub genes were identified which belong to regulatory factors, transporters and signal transduction effectors. We hope that the obtained results would be beneficial toward developing the salt tolerant rice.

Keywords: *Oryza sativa*, Salt stress, Microarray data, Hub analysis, Gene ontology.

* نویسنده مسئول: نادعلی بابائیان جلودار

E-mail: n.babaeian@umz.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

تنش شوری تهدید جدی برای رشد گیاهان و تولیدات کشاورزی در سطح جهان می‌باشد. شش درصد از کل زمین‌های دنیا و ۲۰ درصد از زمین‌های قابل کشت جهان در سطوح مختلف شور می‌باشند (Munns *et al.*, 2008). شوری منجر به کاهش سرعت رشد گیاه و در نهایت مرگ آن می‌شود. با توجه به اهمیت مسئله، یکی از اولویت‌ها افزایش سطح تحمل به تنش شوری در گیاهان زراعی می‌باشد. در این راستا فهمیدن سازوکار پاسخ گیاهان در مواجه با تنش شوری می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در جهت بالابردن سطح تحمل گیاهان زراعی به تنش شوری و اصلاح گیاهان در اختیار بگذارد.

آگاهی از الگوی بیان ژنی به درک بهتر سازوکار ژنتیکی پاسخ به تنش‌های محیطی کمک می‌کند. آنالیز ریزآرایه الگوی بیان تمام ژن‌ها در گیاهان را در اختیار می‌گذارد. برنج گیاهی است که به شدت از تنش‌های محیطی همچون خشکی و شوری تاثیر می‌پذیرد و تولید آن شدیداً کاهش می‌یابد. این در حالی است که بیش از نیمی از مردم دنیا به برنج به عنوان محصول اصلی وابسته اند. بر اساس آمار ارائه شده توسط یونسکو، ایران از لحاظ دارا بودن اراضی شور در سطح جهان مقام پنجم را دارد و بین ۲۰۰ تا ۳۰۰ هزار هکتار از اراضی برنج‌کاری گیلان، مازندران و گلستان با شوری تهدید می‌شود (Mirdar mansuri *et al.*, 2012). با توجه به افزایش جمعیت و گسترش فزاینده اراضی شور، می‌طلبد که در راستای تامین امنیت غذایی، کارایی تولید محصولات کشاورزی در واحد سطح بالا رود که این مهم جز با درک سازوکار پاسخ به تنش شوری در گیاهان امکان‌پذیر نمی‌باشد.

از آنجا که شوری در دو سطح اسمزی و یونی گیاه را دچار تنش می‌کند، در سطح گسترده مسیرهای بیوسنتزی در سلول را مختل می‌کند و پاسخ گیاه مجموعه‌ای از برهم کنش‌ها میان چندین مسیر می‌باشد. لذا صفت تحمل به تنش شوری پلی‌ژنیک است و با تمام مطالعاتی که در سال‌های اخیر در ارتباط با سازوکار سلولی و مولکولی پاسخ به تنش شوری انجام شد و اطلاعات ارزشمندی را ایجاد کرد، ولی هنوز درک درستی از سازوکار تنظیمی تحمل به تنش شوری و حفظ رشد گیاه تحت تنش شوری وجود ندارد و می‌طلبد که در این رابطه تحقیقات کامل‌تری صورت پذیرد (Zhou *et al.*, 2016).

جهت شناسایی ژن‌های مسئول در ایجاد تحمل به تنش شوری مطالعات گسترده‌ای صورت گرفته است و ژن‌های بسیاری در این زمینه شناسایی و معرفی شده‌اند. با توجه به پلی ژنیک بودن تحمل به تنش شوری، می‌طلبد که با جمع‌آوری تمامی ژن‌های معرفی‌شده تاکنون مطالعه‌ی جامعی بر روی ژن‌هایی که تغییر بیان قابل ملاحظه‌ای تحت تنش شوری نسبت به شرایط نرمال دارند، انجام گیرد تا دید جامعی نسبت به عملکرد مجموع این ژن‌ها در ایجاد تحمل به تنش شوری ارائه گردد (Seo *et al.*, 2015). در این زمینه Jyotika *et al.* (2016) در سطح برچسب‌های توالی بیان شده، تعداد۷۷۴۶ EST را از NCBI دانلود و مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند، پس از بررسی‌های هستی‌شناسی و تجزیه پروموتر، تعداد ۱۰ ژن نامزد امید بخش در ایجاد تحمل به تنش شوری را معرفی نمودند (Jyotika *et al.*, 2016). این ژن‌ها در گروه‌های عملکردی متفاوتی معرفی شدند.در سطح ریزآرایه نیز مطالعات صورت گرفته در سطح یک سری داده (Wang *et al.*, 2013) و تجزیه و تحلیل چهار سری از داده‌های ریزآرایه موجود در پایگاه داده‌ها (Seo *et al.*, 2015) ارائه شده است و ژن‌هایی با بیشترین تغییر بیان از گروه‌های کارکردی متفاوت معرفی شدند.

در این پژوهش سعی شده است تا با آنالیز سری داده‌های ریز آرایه موجود در پایگاه داده‌ها و شناسایی تمام ژن‌های دارای بیان افتراقی (بیش از دو برابر یا

Archive of SID

www.SID.ir

کمتر از نصف) در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل، و بافت‌های مختلف گیاه برنج، و همچنین شناسایی ژن‌های کلیدی در شبکه برهم‌کنش پروتئینی، شناخت دقیق‌تری از مسیرهای پاسخ‌دهی برنج به تنش شوری حاصل گردد.

مواد و روش‌ها

آنالیز داده‌های ریزآرایه

جهت شناسایی ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری نه سری از داده‌های ریزآرایه موجود درپایگاه داده‌های NCBI از قسمت GEO (Gene Expression omnibus) دریافت شدند (جدول ۱). آنالیز این نه سری از داده‌ها با استفاده از بسته نرم‌افزاری affy و Bioconductor بر روی زبان برنامه‌نویسی R انجام شد. جهت شناسایی ژن‌های دارای بیان افتراقی در شرایط تنش شوری، تمامی ژن‌های دارای تغییر بیان بیشتر یا مساوی ۲+ و یا کمتر و مساوی ۲− یا به عبارتی Log Fold Change بزرگتر و یا مساوی ۱+ و کوچک‌تر و مساوی ۱− در نظر گرفته شد، همچنین adjusted P-Value در این تحقیق کوچک‌تر و مساوی ۰/۰۵ لحاظ شد.

دسته بندی ژن‌ها

با نرم‌افزار R 3.2.2 و بسته VennDiagram انجام گرفت.

جدول ۱. داده‌های ریزآرایه برنج مورد آنالیز در این پژوهش

ردیف	سری داده	شماره دسترسی	تکنولوژی	نوع داده	ژنوتیپ	بافت	تنش	دوره نموی
1	GPL2025	GSE58603	Affymetrix	cel	IR64	برگ و ریشه	140 mM NaCl+ 10 µM ABA (salt)	گیاهچه
2	GPL17380	GSE48395	ALLIGNMENT	txt	Nipponbare , Pokkali	گیاهچه	250mM NaCl	گیاهچه
3	GPL6864	GSE20746	ALLIGNMENT	txt	Nipponbare	ساقه و ریشه	150 mM NaCl	گیاهچه
4	GPL2025	GSE16108	Affymetrix	cel	CSR27, MI48,	گیاهچه	150 mM NaCl	گیاهچه
5	GPL2025	GSE14403	Affymetrix	cel	FL478, Pokkali , IR63731, IR29	ریشه	NaCl and $CaCl_2$ (5:1 molar concentration)	گیاهچه
6	GPL2025	GSE4438	Affymetrix	txt	IR63731 and IR29 Agami , M103	ساقه	NaCl and $CaCl_2$	گیاهچه
7	GPL2025	GSE3053	Affymetrix	txt	FL478 , IR29	ساقه	NaCl and $CaCl_2$	گیاهچه
8	GPL2025	GSE21651	Affymetrix	cel	Oryza sativa	برگ	NaCl	گیاهچه
9	GPL8852	GSE79043	Agilent	txt	Oryza sativa	گیاهچه	120 mM NaCl	گیاهچه

رسم شبکه برهم‌کنش پروتئینی (PPI)

فهرست نهایی ژن‌ها در نرم افزار تحت وب Rice Interaction Viewer وارد شد و فهرست PPI تهیه شد. در مرحله‌ی بعد برای رسم شبکه برهم‌کنش پروتئینی و شناسایی ژن‌های مؤثر در این شبکه از نرم‌افزار Cytoscape (Smoot *et al.*, 2011) و Cytohubba Plug-in (Chin *et al.*, 2014) استفاده شد. لازم به ذکر می‌باشد که جهت شناسایی ژن‌های قطب (hub genes) در شبکه از ۴ الگوریتم محاسباتی Cytohubba (Degree،

1. Protein-Protein Interaction (PPI)

Archive of SID

www.SID.ir

MNC[1]، MCC[2]، Closeness) استفاده گردید.

آنالیز هستی شناسی ژن

این تجزیه با استفاده از نرم‌افزار تحت وب AgriGO (Du *et al*., 2010) صورت گرفت. در این نرم‌افزار جهت شناسایی گروه‌های عملکردی دارای ژن‌های با بیان افتراقی از روش SEA[3]و برای مقایسه فراوانی ژن‌های هر گروه عملکردی از فهرست Suggested backgrounds که حاوی ۲۳۱۵۵ ژن بود، استفاده شد. همین‌طور جهت محاسبه p-value و adjusted p-value به ترتیب از Fisher exact test و Yekutieli (FDR under dependency) استفاده شد. تمام ژن‌های مورد بررسی بر اساس هر سه گروه اصلی اجزای سلولی، فرآیند های زیستی و عملکرد مولکولی گروه‌بندی و تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج و بحث

از نه سری از داده‌های ریزآرایه که مورد تجزیه قرار گرفتند، در مجموع ۱۳۷۹۸ ژن دارای بیان افتراقی شناسایی شدند. مشخصات سری داده‌های ریزآرایه مورد آنالیز در جدول ۲ آمده است. ژن‌های دارای بیان متفاوت تحت دو شرایط تنش شوری و نرمال در این نه سری داده با بسته Venn در نرم‌افزار R در دو دسته مشاهده شده، در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل تقسیم شدند، که بر این اساس تعداد ۴۶۸ ژن تنها در ارقام حساس و ۱۱۵۹۷ ژن تنها در ارقام متحمل بیان شده بودند (شکل ۱- الف). در این میان، ۱۷۳۳ ژن در هر دو ژنوتیپ حساس و متحمل در شرایط تنش شوری بیان داشتند. شایان ذکر است که از میان نه سری آزمایش مورد بررسی، چهار آزمایش هر دو ژنوتیپ حساس و متحمل، چهار آزمایش تنها ژنوتیپ متحمل و یک آزمایش تنها ژنوتیپ حساس را مورد بررسی قرار داده بودند (جدول ۲).

در این بین بعضی از ژن‌های با بیان متفاوت نسبت به شرایط نرمال افزایش بیان و برخی از ژن‌ها نیز دارای کاهش بیان بودند. دسته‌بندی این ژن‌های دارای افزایش یا کاهش بیان نسبت به شرایط نرمال در شکل ۱- ب آورده شده است.

از میان ژن‌هایی که بیان افتراقی نشان دادند، ۹٪ از ژن‌ها در ارقام حساس افزایش بیان داشتند، در صورتی که در ارقام متحمل در شرایط شور نسبت به شرایط نرمال دارای کاهش بیان شدند. در نقطه مقابل ۰/۷٪ ژن‌ها در ارقام حساس کاهش بیان نشان دادند ولی همین ژن‌ها در ارقام متحمل افزایش بیان داشتند. این نوع ژن‌ها به همراه ۵۹۲۷ ژنی که به‌طور اختصاصی در ارقام متحمل دارای افزایش بیان شدند، حائز اهمیت می باشند.

به جهت اهمیت ژن‌هایی که تنها در ارقام متحمل دارای افزایش بیان معنی‌دار شدند، هستی‌شناسی این ژن‌ها با نرم‌افزار AgriGo بررسی شد. نتایج هستی‌شناسی ژن‌هایی که به صورت انحصاری در ارقام متحمل دارای افزایش بیان شده بودند، نشان داد که در بخش فرآیندهای زیستی ۴۴ دسته ژنی غنی شده بودند؛ از جمله مهمترین گروه‌ها می‌توان به رونویسی (1.10E-102)، پاسخ‌دهنده به تنش[4] (2.60E-75)، پاسخ‌دهنده به محرک‌ها (3.10E-57)، انتقال پیام[6](1.20E-20) و پردازش ترکیبات نیتروژن‌دار (4.60E-260) اشاره نمود (شکل ۲). در بررسی‌های انجام شده در برنج تحت تنش شوری این گروه‌های ژنی جزء مهمترین گروه‌ها در بخش فرآیندهای زیستی معرفی شده‌اند (Yi *et al*., 2016).

1. Maximum Neighborhood Component
2. Mathews Correlation Coefficient
3. Singular enrichment analysis

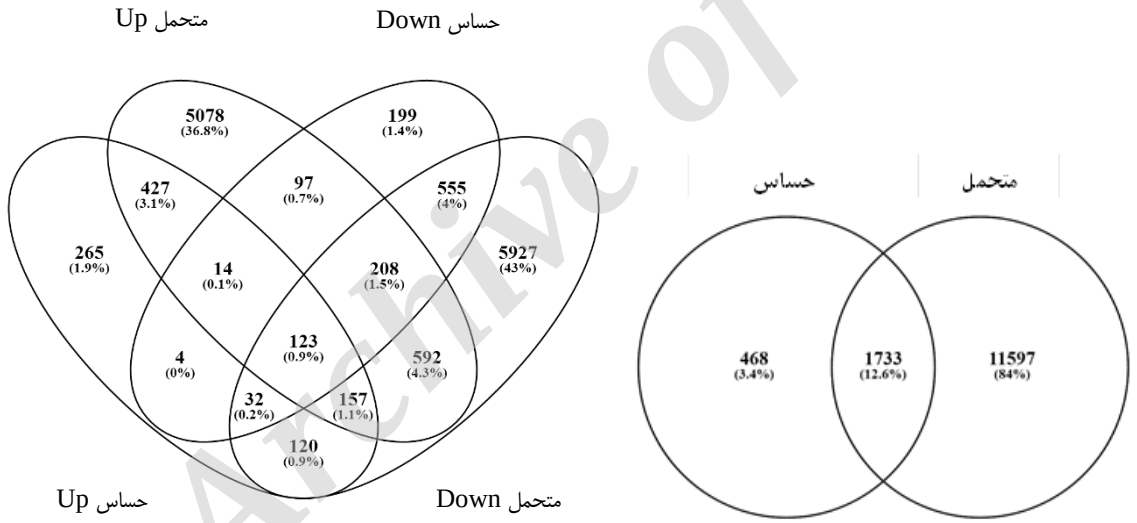
۴ Response to stress
۵ Response to stimulus
۶ Signal transduction
۷ Nitrogen compound metabolic process

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲. داده‌های ریزآرایه برنج مورد آنالیز در این پژوهش

ردیف	شماره دسترسی	مرحله نموی	بافت	نوع داده	ژنوتیپ	کاهش بیان	افزایش بیان
1	GSE58603	گیاهچه	برگ و ریشه	cel	حساس متحمل	912 1035	786 821
2	GSE48395	گیاهچه	گیاهچه	txt	متحمل	6732	6309
3	GSE20746	گیاهچه	ساقه و ریشه	txt	متحمل	2392	3099
4	GSE16108	گیاهچه	گیاهچه	cel	حساس متحمل	169 312	203 199
5	GSE14403	گیاهچه	ریشه	cel	متحمل	41	16
6	GSE4438	گیاهچه	ساقه	txt	حساس	0	21
7	GSE3053	گیاهچه	ساقه	txt	حساس متحمل	0 0	0 0
8	GSE21651	گیاهچه	برگ	cel	حساس متحمل	4071 243	1728 78
9	GSE79043	گیاهچه	گیاهچه	txt	متحمل	0	23



شکل ۱. دسته‌بندی ژن‌های با بیان افتراقی بر اساس ارقام حساس و متحمل

این دسته از ژن‌های دارای افزایش بیان در ارقام متحمل در بخش عملکرد مولکولی در دسته‌های مهمی همچون عوامل رونویسی (1.90E-44)، فعالیت کینازی (1.90E-150) و عوامل رونویسی مرتبط با گروه‌های فسفر (3.70E-188) نسبت به زمینه ژنتیکی برنج غنی شده بودند (شکل۲). بیشترین ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری دارای افزایش بیان در ژنوتیپ‌های متحمل، متعلق به هسته (6.10E-89) بودند (شکل۲). در یک تحقیق که بر روی سه سری از داده‌های ریزآرایه برنج تحت تنش شوری انجام شد، نتایج هستی‌شناسی ۲۷۵۱ ژن که افزایش بیان معنی‌دار داشتند، ۲۸ دسته را در بخش عملکرد مولکولی

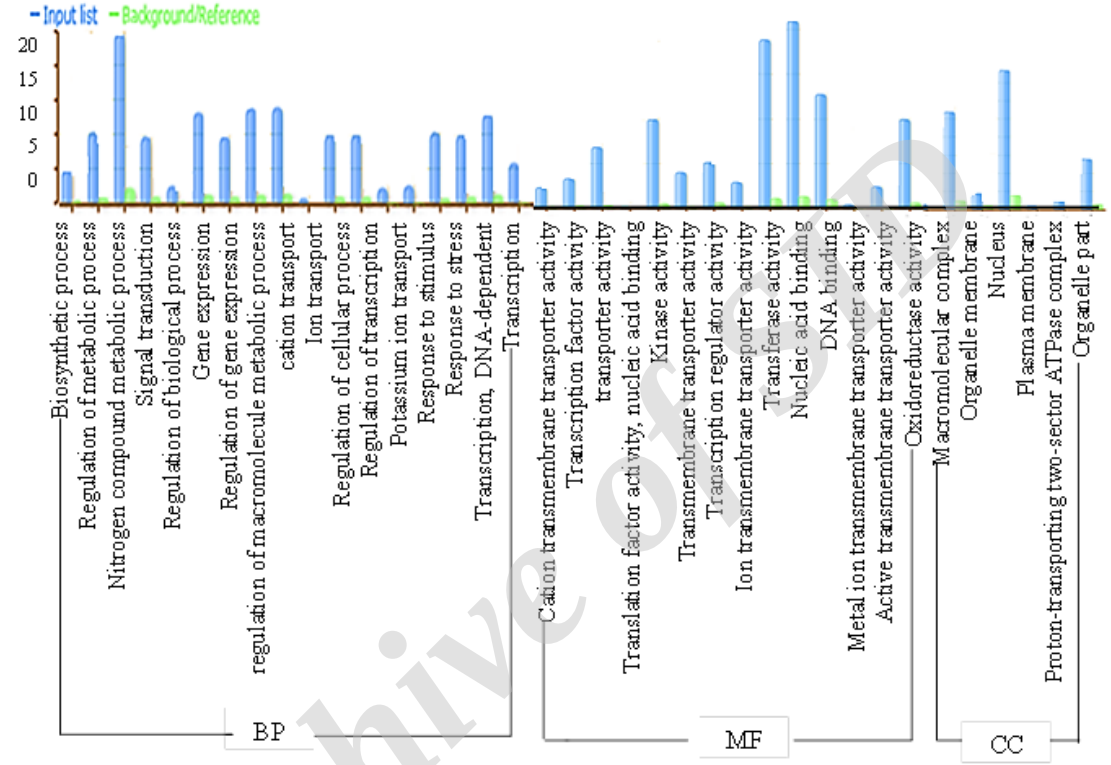
1. Genetic Background

Archive of SID

www.SID.ir

مشخص کرد، دسته‌های رونویسی (GO:0006350)، فعالیت کینازی (GO:0016301) به‌همراه انتقال‌دهنده‌ها (GO:0005215) جز مهمترین گروه‌های غنی‌شده در این تحقیق معرفی شدند (Seo *et al.*, 2015).

دسته‌بندی دیگری نیز در ژن‌های افتراقی صورت گرفت. بر این اساس ژن‌های دارای بیان افتراقی بر اساس اینکه در چه بافتی بیان شدند، مورد دسته‌بندی قرار گرفتند (شکل ۳).



شکل ۲. نتایج هستی‌شناسی ژن‌های دارای افزایش بیان انحصاری در ارقام متحمل برنج

شکل ۳. دسته‌بندی ژن‌های دارای بیان متفاوت بر اساس بافت

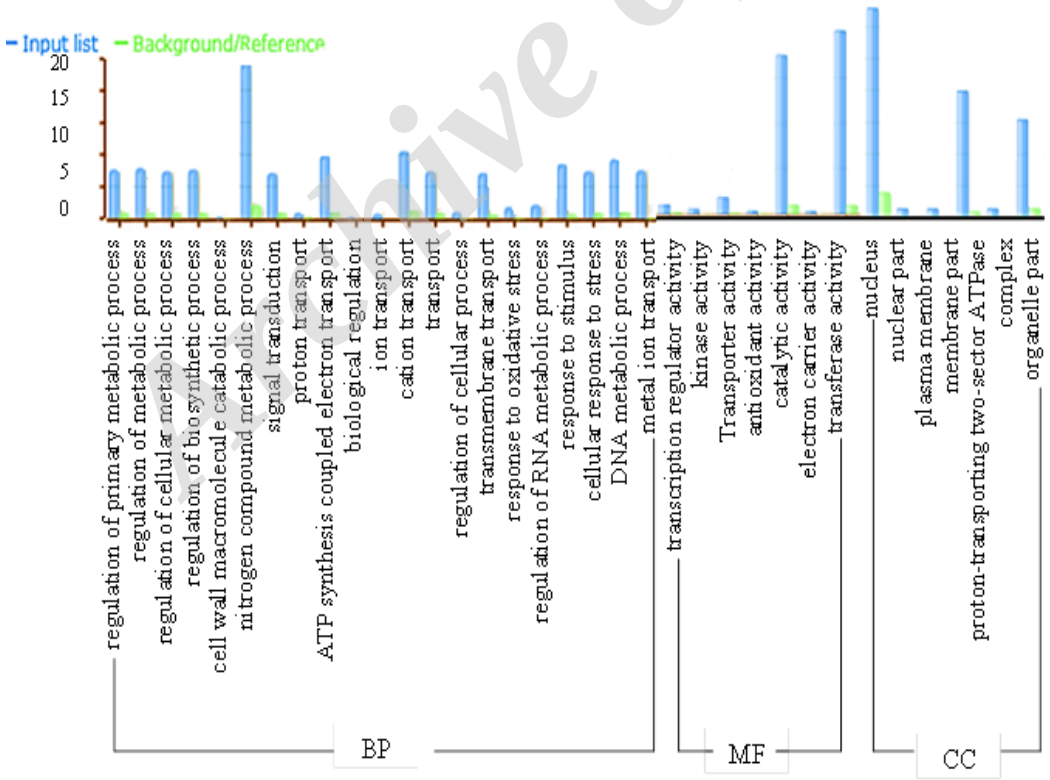
Archive of SID

www.SID.ir

داده‌های ریزآرایه مربوط به چهار بافت ریشه، برگ، ساقه و گیاهچه بوده است. در دسته‌بندی ژن‌های بیان شده بر اساس بافت مشخص شد که از کل ژن‌های با بیان افتراقی، ۳/۲۲٪ ژن‌ها به‌طور انحصاری در ریشه بیان داشتند در صورتی که بیان آن‌ها در بافت‌های دیگر مشاهده نشد. از آنجا که ریشه به عنوان مهمترین عضو پاسخ‌دهنده به تنش شوری می‌باشد، بررسی این ژن‌ها می‌تواند کمک بزرگی به درک پاسخگویی ریشه در مواجهه با تنش شوری نماید (شکل۳).

در این راستا به جهت اهمیت ریشه در مطالعه تحمل به تنش شوری در برنج، ژن‌هایی که تنها دارای بیان افتراقی (۴۲۱۹) در ریشه بودند، مورد تجزیه هستی شناسی قرار گرفتند (شکل۴). در بخش فرآیندهای زیستی از جمله مهمترین گروه‌هایی که غنی شدند می‌توان به پردازش متابولیکی ترکیبات نیتروژن‌دار[1] (FDR=2.40E-191)، پاسخ‌دهنده به تنش[2] (FDR=7.30E-82)، انتقال‌دهنده‌ها[3] (FDR=5.20E-70) و عوامل رونویسی (FDR=4.70E-49) اشاره نمود (شکل ۴).

تجزیه هستی‌شناسی در ریشه در بخش عملکرد مولکولی ۲۱ دسته غنی شده را شناسایی نمود که از این تعداد، ۱۷ دسته تنها در ریشه غنی شدند و در برگ معنی‌دار نشدند. از بین آن‌ها گروه‌های مهمی مانند فعالیت کینازی (FDR=4.10E-89)، عوامل رونویسی (FDR=1.00E-18) و سیگنال پیام رسانی (FDR= 0.039) را می‌توان اشاره نمود (شکل ۴). در بررسی مکان سلولی مشخص شد که بیشتر ژن‌هایی که در پاسخ به تنش در ریشه نقش دارند جایگاه هسته بیشتر غنی شده است (شکل ۴).



شکل ۴. نتایج هستی‌شناسی ژن‌های دارای بیان افتراقی انحصاری در ریشه

1. Nitrogen compound metabolic process
2. Response to stress
3. Transport

Archive of SID

www.SID.ir

در مطالعه Yi *et al.* (2016)، نتایج هستی‌شناسی با تأکید بر اهمیت ریشه در پاسخ به تنش شوری در برنج، بیان شد که بیشترین تعداد ژن‌ها در گروه‌های پاسخ‌دهنده به محرک‌ها و انتقال‌دهنده‌ها غنی شدند (Yi *et al.*, 2016). در این تحقیق مشخص شده است که دسته‌های عملکردی که ژن‌های بیشتری را نمایندگی می‌کنند، نقش مهمی در پاسخ به تنش شوری در برنج دارند (Jyotika *et al.*, 2016).

آنالیز هاب برای ژن‌های دارای بیان افتراقی

جهت شناسایی ژن‌های کلیدی، آنالیز هاب برای ژن‌های افتراقی در دسته ژنوتیپ‌های متحمل در ۹ سری داده‌های ریزآرایه صورت گرفت. بدین منظور ابتدا با وارد کردن فهرست ژن‌های افتراقی در هر مورد با فرمت MSU-loci در نرم‌افزار تحت وب تحت عنوان Rice interaction viewer وارد شدند و فهرست برهم کنش‌های پروتئینی (PPI) آنها بدست آمد. این فهرست برهم‌کنش پروتئینی وارد نرم افزار Cytoscape version 2.8.0 شد و با استفاده از ۴ الگوریتم Cytohubba Plug-in، ژن‌های هاب برای فهرست برهم کنش‌های پروتئینی به‌دست آمد، که مشخصات آنها به تفکیک در جدول ۳ آمده است.

جدول ۳. فهرست ژن‌های کلیدی که در ژنوتیپ‌های متحمل برنج شناسایی شده‌اند

ردیف	علامت اختصاری ژن	نام ژن	دسته عملکردی ژن	مکان سلولی ژن	الگوریتم انتخاب‌کننده
1	Os05g0524400	PFK	کیناز	میتوکندری	mcc
2	Os07g0486500	Auxin-regulated protein-like	سیگنال ترارسانی	سیتوپلاسم	Closeness,degree,mcc
3	Os10g0415900	GCN5	تنظیم کننده رونویسی	هسته	Closeness,degree,mnc,mcc
4	Os01g0293000	METK3	انتقال دهنده پتاسیم	کلروپلاست	Closeness
5	Os04g0629700	–	تنظیم کننده مسیرهای متابولیکی	هسته	degree,mnc
6	Os03g0788500	CPK10	کیناز	غشا	mcc
7	Os07g0637300	Pyruvate dehydrogenase kinase 1	کیناز	هسته	mcc
8	Os03g0670700	Glycine-rich RNA binding protein	کیناز	هسته	mcc
9	Os12g0188700	TRXM	انتقال دهنده و پاسخ دهنده به محرک های اکسیداتیو	کلروپلاست و پلاستید	mcc
10	Os03g0646800	-	فاکتور رونویسی	هسته	closeness

طی بررسی ژن‌های کلیدی که در آنالیز هاب شناسایی شدند، مشخص شد که بیشتر این ژن‌ها در دسته پروتئین کینازها قرار می‌گیرند. کینازها نقش کنترل کننده در فرایندهای مختلف سلولی از جمله پاسخ به محرک‌ها را بر عهده دارند (Hadiarto & Tran, 2011). *PFK*، *CPK10*، *Pyruvate dehydrogenase kinase 1* و *Glycine-rich RNA binding protein* از جمله کینازهای کلیدی

Archive of SID

www.SID.ir

شناسایی شده در این پژوهش می باشند.

*CDPK*ها در برنج ۳۱ عضو دارند. این ژن‌ها نقش فعالی در پاسخ دهی به تنش‌های مختلف مثل سرما، خشکی و شوری دارند و القای این ژن‌ها در پاسخ به تنش شوری، به عناصر سیس[1] موجود در پروموتر آنها مرتبط است. به طور کلی *CDPK*ها به صورت مثبت و منفی فعالیت‌های عوامل رونویسی، آنزیم‌های متابولیکی، ترانسپورترهای یونی و انتقال‌دهنده‌های آب را تحت تنش شوری و خشکی تنظیم می‌کنند (Boudsocq *et al*., 2013). لذا در تحقیقات مشخص شده که این ژن‌ها نقش تنظیمی مهمی در پاسخ‌دهی به تنش شوری دارند. همان‌طور که می‌دانیم گیاه تحت تنش شوری با افزایش پروتئین‌های درگیر در مسیرهای متابولیکی سعی می‌کند که انرژی مورد نیاز خود را تامین کند، یکی از این ژن‌ها *Pyruvate dehydrogenase kinase 1* است. گیاه وقتی تحت تنش شوری قرار می‌گیرد نیاز به افزایش تولید انرژی دارد و در گیاهان متحمل به تنش شوری افزایش زیرساخت‌های تولید ATP از جمله این ژن دیده می‌شود (Kosova *et al*., 2013).

Glycine-rich RNA-binding proteins (GRPs) تنظیم‌کننده‌های پس از رونویسی هستند، که نقش کلیدی در پاسخ به تنش‌ها از جمله تنش شوری دارند و در گیاهان متحمل تحت تنش افزایش بیان پیدا می‌کنند. با افزایش بیان این ژن در گیاهان مختلف دیده شده است که سطح تحمل گیاه به تنش شوری و نیز وزن خشک آن افزایش بیان می‌یابد (Wang *et al*., 2012). از جمله دیگر کینازهای مهم کلیدی شناسایی شده می‌توان به *Phosphofructokinase* (*PFK*) اشاره نمود که از جمله آنزیم‌های محدود کننده در شبکه ژنی[2] مرتبط با مسیر کنترل کربن هستند. در شرایط تنش، گیاه سعی می‌کند تا آسیب ناشی از تجمع ROS را با افزایش سطح پرولین و آنزیم‌هایی مانند SOD، POD و CAT کاهش دهد (Inupakutika *et al*., 2016). با افزایش زمان تنش، این امر منجر به کاهش فعالیت‌های متابولیکی گیاه می‌شود. از آنجایی که *PFK* در کنترل کربن نقش دارد، گیاه با حفظ سطح و فعالیت این ژن تحت شرایط تنش می‌تواند ATP مورد نیاز خود را تامین نماید (Yao *et al*., 2016; Lee *et al*., 2016).

دسته دوم ژن‌های تنظیمی عوامل رونویسی را شامل می‌شوند. از جمله این ژن‌ها می‌توان به *GCN5* اشاره کرد. این ژن در Uniprot در بخش فرایندهای زیستی به‌عنوان عامل رونویسی و نیز تنظیم‌کننده رونویسی معرفی شده است و نیز در بخش عملکرد مولکولی نقش فعال‌کننده هیستون استیل ترانسفراز برای آن عنوان شده است. استیلاسیون هیستون به عنوان شناسه هدفمند خاص در تنظیم رونویسی در فرآیند اپی‌ژنتیک شناخته می‌شود، که از طریق تغییر شکل در کروماتین، میزان رونویسی را تنظیم می‌کند. این ژن در رشد و توسعه گیاه نقش مهمی دارد، اثبات شده است که این ژن در پاسخ‌دهی به تنش‌های مختلف از جمله شوری در گیاهان مختلف، همین‌طور برنج نقش ایفا می‌کند (Fang *et al*., 2014).

تحت تنش شوری یون‌های سدیم و پتاسیم برای ورود به داخل گیاه باهم رقابت می‌کنند، چنانچه در زمان مواجهه با تنش شوری جذب پتاسیم به عنوان یون غالب نسبت به یون سدیم باشد، گیاه تحمل بیشتری به تنش شوری نشان می‌دهد و بدین ترتیب سمیّت سدیمی در گیاه کاهش می‌یابد. از جمله ژن‌های کلیدی که در این تحقیق شناسایی شدند، ژن *METK3* می‌باشد، که در uniprot عملکرد Potassium binding برای آن تعریف شده است.

1. Cis-regulatory elements
2. Pathway

Archive of SID

www.SID.ir

جذب پتاسیم و جایگیری آن در گیاه توسط ترانسپورترهای مختلف پتاسیمی، جهت تامین پتاسیم مورد نیاز گیاه در شرایط شور بسیار حیاتی است (Chen *et al*., 2015).

در برنج تنش شوری منجر به تخریب سلول‌ها و فرایندهای فیزیولوژیکی می‌شود، در نتیجه تعادل متابولیکی به هم می‌ریزد و سطح گونه‌های اکسیژن فعال افزایش می‌یابد، در این شرایط گیاهان راهکارهای متفاوتی را برای ایجاد هموستازی در سلول‌هایشان به‌کار می‌گیرند. تحت شرایط تنش خانواده ژنی *TRXM* در سلول القا می‌شود، این ژن یک اکسیدوردوکتاز است و در کاهش و ایجاد تعادل ROSها در گیاهان خصوصاً در برنج مؤثر واقع می‌شود (Krasensky *et al*., 2014).

جهت ایجاد تحمل به تنش شوری نیاز است که ژن‌هایی با کارکردهای متفاوت از جمله ترانسپورتری، سیگنال ترارسانی و ژن‌های تنظیمی بیان شوند، تا در مواجهه با تنش شوری در گیاه ایجاد تحمل نمایند. در این پژوهش نیز مشخص شده است که در تمام این سه دسته، ژن‌هایی به عنوان ژن‌های کلیدی در ژنوتیپ‌های متحمل به تنش شوری معرفی شده‌اند. تنش شوری منجر به تجمع سدیم در سیتوزول و ایجاد سمیّت در سلول می‌شود (Roy *et al*., 2014)، تحت این شرایط پتاسیم به عنوان یون مهم در واکنش‌های فیزیولوژیکی نقش ایفا می‌کند و گزارش شده است که حفظ تعادل سدیم و پتاسیم می‌تواند در افزایش تحمل گیاه به تنش شوری مؤثر واقع شود (Qian *et al*., 2017). به نظر می‌رسد با توجه به نتایج موجود، ژنوتیپ‌های متحمل علاوه بر جلوگیری از ورود بیش از اندازه سدیم از طریق بیان ترانسپورترهای پتاسیمی که کلیدی‌ترین آن‌ها در این پژوهش *METK3* بوده است، سعی می‌کنند تا تعادل میان این دو یون را حفظ کنند. از طرفی گیاه متحمل فرایندهای مختلف سلولی را نیز از جمله تامین زیرساخت‌های تولید انرژی و ورود کربن در مواجهه با تنش شوری از طریق تنظیم‌کننده‌های رونویسی کنترل می‌نمایند. در بررسی‌های مختلف بیان شده است که تنظیم‌کننده‌های رونویسی مهمترین نقش را در پاسخ دهی به تنش شوری دارند (Rama *et al*., 2016). این عوامل علاوه بر تنظیم در سطح رونویسی، در فرآیند انتقال پیام نیز نقش مهمی ایفا می‌کنند (Shinozaki *et al*., 2007). در این زمینه علاوه بر عوامل ژنتیکی، فاکتورهای اپی‌ژنتیکی نیز نقش مؤثری در پاسخ‌دهی و ایجاد تحمل به تنش شوری ایفا می‌کنند. از جمله این فاکتورهای اپی‌ژنتیکی استیله شدن و تغییر شکل کروماتین است که رونویسی را تنظیم می‌کنند و از جمله کلیدی‌ترین این عوامل *GCN5* در این پژوهش معرفی شده است. نتیجه این پژوهش تاکیدی بر این مطلب است که مکانیسم پاسخ‌دهی به تنش شوری بسیار پیچیده است و توسط ژن‌های زیادی کنترل می‌شود (Priyanka *et al*., 2015). بنابراین شناسایی ژن‌های قطب و کلیدی می‌تواند امید بیشتری را برای بهبود تحمل به تنش شوری در برنج و سایر گیاهان ایجاد کند. امید است که ژن‌های قطب معرفی شده در این تحقیق در دست‌ورزی برنج، جهت بالابردن سطح تحمل آن به تنش شوری مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

این پژوهش قسمتی از پروژه‌ای است که از طرف طرح کلان شوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و ستاد توسعه زیست‌فناوری مورد حمایت قرار گرفت، بدین وسیله از این مجموعه‌ها برای تأمین منابع مالی این پروژه، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Boudsocq M, Sheen J (2013) CDPKs in immune and stress signaling. Trends in Plant Science. 18(1): 30-40.

Chen G, Hu Q, Luo L, Yang T, Zhang S, Hu Y, Xu G (2015) Rice potassium transporter OsHAK1 is essential for

Archive of SID

www.SID.ir

maintaining potassium-mediated growth and functions in salt tolerance over low and high potassium concentration ranges. Plant, Cell & Environment. 38(12): 2747-2765.

Chin C-H, Chen S-H, Wu H-H, Ho C-W, Ko M-TLin C-Y (2014) cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. BMC Systems Biology. 8(4): 1.

Dub Z, Zhou X, Ling Y, Zhang Z, Su Z (2010) agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. Nucleic Acids Res. 38: W64-W70.

Fang H, Liu X, Thorn G, Duan J, Tian L (2014) Expression analysis of histone acetyltransferases in rice under drought stress. Biochemical and Biophysical Research Communications. 443(2): 400-405.

Hadiarto T, Tran L (2011) Progress studies of drought-responsive genes in rice. Plant Cell Reports. 30(3): 297-310.

Inupakutika MA, Sengupta S, Devireddy AR, Azad RK, Mittler R (2016) The evolution of reactive oxygen species metabolism. J.Exp.Bot. 67(21): 5933-43.

Jyotika B, Pavan C, Anil R, Kishore G, Soma M, Sanjeev K (2016) In-Silico Prediction and Functional Analysis of Salt Stress Responsive Genes in Rice (*Oryza sativa*). Rice Res.4(1):2375-4338.

Kosova K, Prasil IT, Vitamvas P (2013) Protein contribution to plant salinity response and tolerance acquisition. International Journal of Molecular Sciences.14(4): 6757-6789.

Krasensky J, Broyart C, Rabanal FA, Jonak C (2014) The redox-sensitive chloroplast trehalose-6-phosphate phosphatase AtTPPD regulates salt stress tolerance. Antioxidants & Redox Signaling. 21(9): 1289-1304.

Lee K, KwonS, Hwang J, Han S, Jung I, Kim J, Kang S (2016) Genome-wide expression analysis of a rice mutant line under salt stress. Genetics and Molecular Research: GMR. 15(4): 1-15.

Mirdar Mansuri Sh, Babaeian N, Bagheri N (2012) Effect of NaCl stress on Iranian rice genotypes in reproductive stageon the base of tolerance indexes and screen by Biplot method. Plant Production. 19(1): 67-84.

Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. Annu. Rev. Plant Biol. 59: 651-681.

Priyanka D, Kamlesh KN, Sneh LS, Ashwani P (2015) Understanding salinity responses and adopting omics-based approaches to generate salinity tolerant cultivars of rice. Frontiers in Plant Science. 6(712): 1-16.

Wang C, Zhang DW, Wang YC, Zheng L, Yang, CP (2012) A glycine-rich RNA-binding protein can mediate physiological responses in transgenic plants under salt stress. Molecular Biology Reports. 39(2): 1047-1053.

Wang J, Chen L, Wang Y, Zhang J, Liang Y, Xu D (2013) A computational systems biology study for understanding salt tolerance mechanism in rice. PLoS One, 8(6): e64929.

Yao K, Wu Y (2016) Phosphofructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in response to drought and bicarbonate stress at transcriptional and functional levels in mulberry. Russian Journal of Plant Physiology. 63(2): 235-242.

Qian Li, Yang A, Wen Zh (2017) Comparative studies on tolerance of rice genotypes differing in their tolerance to moderate salt stress. BMC Plant Biology. 17(141): 1-13.

Rama S, Annapurna B, Mukesh J (2016) Transcriptome analysis in different rice cultivars provides novel insights into desiccation and salinity stress responses. Scientific Reports. 6 (23719): 1-15.

Roy SJ, Negrao S, Tester M (2014) Salt resistant crop plants. Curr. Opin. Biotech. 26: 115-24.

Shinozaki KY, Amaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Experimental Botany. 58(2): 221-227.

Seo WK, Hee JJ, Ki HJ (2015) Integrating omics analysis of salt stress-responsive genes in rice. Genes Genom. 1-11.

Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang P-LIdeker T (2011) Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. Bioinformatics. 27(3): 431-432.

Yi Z, Ping Y, Fenglei C, Fantao Z, Xiangdong L, Jiankun X (2016) Transcriptome Analysis of Salt Stress Responsiveness in the Seedlings of Dongxiang Wild Rice (*Oryza rufipogon* Griff. PLoS One. 11(1):1-25.

Zhou Y, Yang P, Cui F, Zhang F, Luo X, Xie J (2016) Transcriptome analysis of salt stress responsiveness in the seedlings of Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). PloS one, 11(1): e0146242.

Archive of SID

www.SID.ir