

Expressional profiling study of *lavandula angustifolia* l. in response to drought stress by using transcriptome analysis.

Hamideh Ghajar

Ph.D. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: hamideh_ghajar@hotmail.com

* Hassan Soltanloo

Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: Soltanlooh@gmail.com

S. Sanaz Ramezani

Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: Ramezani@sau.ac.ir

Elahe Tavakol

Assistant Professor, Department of Crop Production and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran. Email: etavakol@shirazu.ac.ir

Vahid Shariati

Assistant Professor, Department of Plant Molecular Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran. Email: v.shariati@nigeb.ac.ir

Abstract

Objective

Drought stress is a major problem that plagues world's arable lands and poses major limitations to plant growth and productivity. *Lavandula angustifolia* L. is a medicinal and aromatic plant that has great value for its essential oil. Due to the relatively resistant nature of this plant to water deficit, it can be a good substitute for plants with high water demand. To identification of some of genes involved in response to drought stress, we carried out transcriptome analysis under normal and drought condition using RNA-Seq.

Materials and methods

Illumina HiSeq. 2000 was applied for sequencing of flower and leaf mRNAs under control and stress conditions. Also the activity of some antioxidant enzymes and level of Malondialdehyde and Dityrosine were measured.

Results

Among a total of 264126 transcripts, 1083 DEGs in flower and 150 DEGs in leaf were identified in response to the drought stress. Gene Ontology Enrichment of drought responsive DEGs including catalytic activity, response to stimulus and binding were identified. KEGG analysis showed different pathways associated with stress such as biosynthesis of secondary metabolites, glutathione and proline metabolism and plant hormone signal transduction. Also some unigenes related to antioxidant enzymes were highlighted in response to drought.

Conclusion

The transcriptome data generated here is the first report of RNA-Seq for *Lavandula angustifolia* L. under drought stress. Biochemical analysis results in this study were consistent with the RNA-seq results. Our findings offer insights into the molecular networks of *Lavandula angustifolia* L. in response to drought stress.

Keywords: Biochemical analysis, Differentially Expressed Genes (DEGs), Gene Ontology (GO), RNA-Seq

Citation: Ghajar H, Soltanloo H, Ramezanzpour SS, Tavakol E, Shariati V (2020) Expressional Profiling Study of *Lavandula angustifolia* L. in Response to Drought Stress by using Transcriptome Analysis. Agricultural Biotechnology Journal. 12(1), 101-124.

Agricultural Biotechnology Journal 12(1), 101-124.

DOI: 10.22103/jab.2020.14785.1172

Received: January 9, 2020; Accepted: February 10, 2020

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

مطالعه نیمرخ بیانی در گیاه اسطوخودوس انگلیسی تحت تنش خشکی با روش توالی‌یابی

رونوشت‌ها

حمیده قجر

دانشجوی دکترا، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. hamideh_ghajar@hotmail.com

حسن سلطانو

دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. Soltanlooh@gmail.com

سیده ساناز رمضانپور

دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. Ramezanpours@gau.ac.ir

الیه توکل

استادیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران. etavakol@shirazu.ac.ir

وحید شریعتی

استادیار گروه زیست فناوری مولکولی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران. v.shariati@nigeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۱

چکیده

هدف: خشکی از مهمترین عوامل محدودکننده زمین‌های کشاورزی بوده و اثرات نامطلوبی بر رشد و تولید گیاهان اعمال می‌کند. اسطوخودوس انگلیسی گیاهی دارویی و معطر است که به دلیل ارزش اسانس آن از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است. با توجه به ماهیت نسبتاً مقاوم این گیاه به کم‌آبی، می‌تواند جایگزین مناسبی برای گیاهان دارای نیاز آبی بالا در کشور باشد. به منظور شناسایی برخی ژن‌های دخیل در پاسخ به خشکی در گیاه اسطوخودوس انگلیسی، تحلیل ترنسکریپتوم این گیاه در شرایط تنش خشکی و شاهد با بکارگیری فناوری RNA-Seq انجام پذیرفت.

روش: RNAهای پیام‌رسان بافت برگ و گل گیاهان شاهد و تحت تنش خشکی توسط Illumina HiSeq. 2000 توالی‌یابی شد. ضمن اینکه فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، مالون‌دآلدئید و دی‌تیروزین در گیاهان شاهد و تحت تنش اندازه‌گیری شد. **یافته‌ها:** از مجموع ۲۶۴۱۲۶ رونوشت توالی‌یابی شده، ۱۰۸۳ ژن در بافت گل و ۱۵۰ ژن در بافت برگ در اثر اعمال تنش خشکی نسبت به گیاهان شاهد بیان افتراقی داشتند. چندین گروه GO شامل فعالیت کاتالیتیکی، پاسخ به محرک‌ها و اتصال، در ژن‌های دارای بیان افتراقی غنی شدند. همچنین آنالیز KEGG، مسیرهای مختلف مرتبط با تنش مثل سنتز متابولیت‌های ثانویه،

متابولیسم گلوتاتیون و پرولین و انتقال سیگنال هورمونی را شناسایی نمود. ضمن اینکه برخی ژن‌های مرتبط با آنزیم‌های آنتی-اکسیدانت در این تحقیق شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر اولین گزارش از کاربرد RNA-Seq در گیاه اسطوخودوس انگلیسی تحت تنش خشکی است. تحلیل بیوشیمیایی صورت گرفته در این تحقیق نیز با نتایج به دست آمده از RNA-Seq مطابقت داشته است. یافته‌های حاصل از این تحقیق درک ما را از شبکه مولکولی پاسخ دهنده به تنش خشکی در گیاه اسطوخودوس انگلیسی توسعه داده است.

کلیدواژه‌ها: آنالیز بیوشیمیایی، انتولوژی ژن (GO)، ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs)، RNA-Seq

مقدمه

خشکی مهمترین عامل غیرزنده محدود کننده رشد و نمو گیاه است و تخمین زده می‌شود که ۷۰ درصد کاهش محصولات کشاورزی در سراسر دنیا را سبب شود (Wu et al. 2017). مدل‌های تغییر اقلیم جهانی، تغییرات آب و هوایی شدید و متوالی به همراه افزایش گرمای عمومی زمین را پیش‌بینی می‌کنند (Feller & Vaseva 2014). به همین دلیل انتظار می‌رود کمبود آب شدیدتر و اثرات آن بر گیاهان و کشاورزی در آینده مخرب‌تر شود. گیاهان در مواجهه با خشکی، گستره وسیعی از پاسخ‌ها از بیان مولکولی گرفته تا متابولیسم شیمیایی را راه‌اندازی می‌کنند و در این راه تعداد زیادی ژن و مسیرهای پیچیده و متنوع تنظیم رونویسی و بیان ژن را توسعه داده‌اند (Chaves et al. 2003). مطالعات مختلفی با هدف درک مکانیسم‌های مولکولی پاسخ به خشکی در گیاهان مختلف انجام شده است؛ اگرچه شبکه ژنی پاسخ به تنش خشکی هنوز کاملاً شناخته نشده است (Min et al. 2016).

اسطوخودوس انگلیسی (*Lavandula angustifolia*) از جمله گونه‌های اسطوخودوس (Lavender)، گیاهی با قدمت بیش از دو هزار سال می‌باشد که به همراه جنس‌های مریم‌گلی، نعنای، آویشن، ریحان و... عضو خانواده نعنائیان^۱ هستند. این گیاه چندساله، همیشه سبز و بومی نواحی مدیترانه‌ای است. قسمت‌های پایین ساقه، چوبی اما بخش‌های بالایی سبز است. برگ‌ها خطی و نوک‌تیز با لبه‌های منحنی شکل هستند. گل‌ها به صورت مجتمع در انتهای یک ساقه بلند قرار می‌گیرند که سرشاخه گلدار نامیده می‌شوند (Lis-Balchin 2002). استفاده از اسطوخودوس در درمان بیماری‌ها تاریخی طولانی دارد. عصاره اسطوخودوس در درمان تب، اسپاسم عضلانی، دل پیچه و عفونت میکروبی به کار می‌رود. همچنین اسطوخودوس در آروماتراپی^۲، درمان استرس، خستگی و بی‌خوابی کاربرد دارد. خواص ضد درد و تسکین‌دهندگی اسطوخودوس از جمله تسکین سردرد ثابت شده، اثرات آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌اسپاسمی، فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی از دیگر مزایای اسطوخودوس است (Nunes et al. 2015).

1. Lamiaceae
2. Aromatherapy

براساس گزارش منتشر شده از مرکز ملی پایش و هشدار خشکسالی سازمان هواشناسی کشور، ۹۷ درصد مساحت ایران تحت تاثیر درجات مختلفی از خشکسالی قرار دارد؛ لذا کشت و پرورش گیاهان با نیاز آبی کمتر، راهکار موثری برای جایگزینی کشت‌های رایج که آب بیشتری نیاز دارند، می‌باشد. به دلیل ویژگی‌های اکولوژیکی اسطوخودوس و مقاومت این گیاه در برابر خشکی و ضرورت کاهش مصرف آب، کشت این گیاه با استفاده از حداقل آبیاری امکان‌پذیر است. با توجه به نیاز این گیاه به نور فراوان، رطوبت کم، هوای گرم و خاک سبک شنی، با بسیاری از مناطق ایران سازگار است (Tavackoli nekoo 2017).

مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده در اواخر دهه ۸۰ میلادی، مکانیسم‌های مولکولی را در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) قرار داد (Mohammadabadi & Tohidinejad 2017). در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از ژن‌ها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Tohidinejad et al. 2015). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند. بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می‌باشد. تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود و بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد. همچنین مقدار محصولات یک ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi et al. 2017). یکی از اقدامات اساسی در موجودات زنده مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Jafari et al. 2016).

علاوه بر رهیافت‌های کشاورزی و فیزیولوژیکی، ژنومیکس نیز فرصت‌های جدیدی جهت موشکافی و تشریح صفات کمی با کمک MAS^۳ و با ویرایش مستقیم ژن‌ها با کمک مهندسی ژنتیک می‌دهد. استفاده از ابزار ژنومیکس کارکردی در تحقیقات مربوط به اثر تنش‌های غیر زنده بر گیاهان، دانش ما را درباره مکانیسم‌های مولکولی مسئول در تحمل تنش و تولید گیاهان متحمل افزایش داده است (Shelden & Roessner 2013). شناسایی ژن‌ها و بازسازی شبکه‌های تنظیمی افق جدیدی در راستای فهم چگونگی ساز و کار فرایندهای زیستی می‌گشاید (Shahabi et al. 2019).

توسعه روش‌های توالی‌یابی جدید با بازده بالا امکان نقشه‌یابی و کمی‌سازی ترانسکریپتوم را فراهم کرده است. این روش که اصطلاحاً RNA-Seq^۴ نامیده می‌شود، مزایای روشی بر دیگر روش‌ها دارد و تحولات وسیعی در آنالیز و بررسی ترانسکریپتوم یوکاریوت‌ها پدید آورده است. RNA-Seq تکنیک ارزشمندی در تحقیق بیان افتراقی ژن‌ها، توسعه مارکرهای مولکولی و شناسایی و کشف ژن‌ها بخصوص زمانیکه توالی ژنوم مرجع در دسترس نباشد، می‌باشد (Ozsolak & Milos 2011). اخیراً در مطالعات چندی از فن‌آوری RNA-Seq جهت شناسایی ژن‌های حاضر در مسیرهای دخیل در تولید اسانس و متابولیسم ترپنویید-ها در گیاه اسطوخودوس انگلیسی استفاده شده است (Adal et al. 2019; Li et al. 2019). از کاربردهای مهم RNA-Seq،

3. Marker Assisted Selection
4. RNA sequencing

مطالعه پاسخ‌های گیاه و روال سازگاری با تنش‌های زنده و غیرزنده است (Dugas et al. 2011). پیشرفت‌های روزافزون در فناوری‌های توالی‌یابی و مهندسی ژنتیک، نگرش‌های مبتنی بر انتقال ژن را به عنوان مسیری موثر در جهت فراهم نمودن صفات هدف مطلوب توسعه داده است. این پیشرفت‌ها انقلاب جدیدی را در اصلاح گیاهان با هدف ایجاد گیاهان مقاومتر آغاز کرده است. برای نیل به این هدف تلاش‌های بیشتری در زمینه شناسایی ژن‌های موثر در ایجاد مقاومت به خشکی نیاز است (Ye et al. 2018). تاکنون فن‌آوری RNA-Seq جهت بررسی ترانسکریپتوم گیاه اسطوخودوس در پاسخ به تنش خشکی به کار گرفته نشده است، در حالیکه مطالعات زیادی از این فن‌آوری جهت بررسی شبکه ژنی پاسخ به تنش خشکی در گیاهان مختلف بهره جسته‌اند؛ لذا در این مطالعه از تحلیل RNA-Seq جهت شناسایی بخشی از ژن‌های کلیدی دخیل در مکانیسم‌های تحمل در گیاه اسطوخودوس که در معرض تنش خشکی قرار گرفته بودند، استفاده شد. ژن‌های شناسایی شده در این مطالعه می‌تواند به عنوان ژن‌هایی کاندید جهت مهندسی گیاهان و افزایش تحمل به تنش خشکی استفاده شود. علاوه بر شناسایی ژن‌های افتراقی، برخی از مسیرهای تنظیمی جهت مقابله با خشکی نیز در این گیاه شناسایی شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به صورت طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و در سه تکرار، در ایستگاه تحقیقات کشاورزی گرگان انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل چهار سطح آبیاری ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی بود. گلدان‌هایی با ظرفیت هشت کیلوگرم خاک، ارتفاع ۲۸ و قطر دهانه ۲۲ سانتی‌متر تهیه شده و همگی با خاک یکسان پر شدند. جهت ارزیابی ظرفیت نگهداری آب در خاک مورد استفاده، گلدان‌ها تا درجه اشباع آبیاری شده و پس از خروج آب آزاد خاک از گلدان‌ها و رسیدن به وزن ثابت، مجدداً توزین صورت پذیرفت. جهت اندازه‌گیری ظرفیت زراعی خاک، از خاک مورد استفاده نمونه‌گیری شد. این خاک در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۴۸ ساعت در آون خشک شده و وزن شد. درصد آب خاک و ظرفیت زراعی از رابطه شماره ۱ (Klute 1986) به دست آمد. در نهایت وزن هر گلدان براساس تیمار مربوطه محاسبه و تنظیم گشت.

$$\text{رابطه ۱)} \quad \text{وزن خشک خاک} - \text{وزن تر خاک} \times 100 = \frac{\text{درصد آب خاک}}{\text{وزن خشک خاک}}$$

کشت بذور در بهمن ماه سال ۹۶ صورت پذیرفت و آبیاری به صورت یکسان برای تمامی گلدان‌ها انجام شد. اعمال تنش خشکی در بهار و قبل از شروع گلدهی آغاز شد و به مدت ۲ ماه ادامه یافت. در طول دوره اعمال تنش هرروزه گلدان‌ها وزن شده و کاهش وزن هر گلدان نسبت به وزن مشخص شده در هر تیمار، با افزودن آب جبران و به این ترتیب وزن هر گلدان ثابت نگه داشته شد. ۲ ماه بعد از شروع اعمال تنش و در خرداد ماه ۹۷ نمونه‌گیری از برگ و گل صورت پذیرفت. بافت گیاه جهت تحلیل‌های بعدی در یخچال ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. به منظور انتخاب بهترین تیمار جهت انجام توالی‌یابی، عملکرد برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان این گیاه شامل آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (Minami & Yoshikawa 1979)، کاتالاز (Aebi

(1984)، آسکوربات پراکسیداز (Wang et al. 1991)، پیروکسیداز (Kandpal Rajendra et al. 1981) و گلوکاتینون رداکتاز (Arora et al. 2002) در برابر درجات مختلف کم‌آبی بررسی گشت. ضمن اینکه ارزیابی مقدار مالون‌دی‌آلدئید به عنوان یکی از نشانگرهای سنجش تنش اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدها (Sharma et al. 2012) و دی‌تیروزین به عنوان نشانگری جهت سنجش میزان تخریب اکسیداتیو پروتئین‌ها و در نتیجه ارزیابی شدت تنش به کار گرفته شد (Brady & Fry 1997). از اندازه‌گیری مقدار TBARS جهت اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید استفاده شد (Ohkawa et al. 1979). سنجش دی‌تیروزین براساس روش شرح داده شده توسط آمادو و همکاران (۱۹۸۴) صورت پذیرفت (Amado et al. 1984). تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار R و مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD (حداقل اختلاف معنی‌دار) انجام شد.

جهت استخراج RNA از کیت کبازن^۵ استفاده شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با کمک اسپکتروفتومتر نانودراپ^۶ و ژل آگارز ۱/۵ درصد تایید گشت. تمامیت نمونه‌ها (RIN^۷) توسط دستگاه بایو آنالایزر^۸ سنجیده شده و تمام نمونه‌ها RIN بالای ۷/۷ داشتند که جهت انجام توالی‌یابی مناسب تشخیص داده شد. توالی‌یابی در موسسه ژنومیکس بیجینگ^۹ و با دستگاه ایلومینا^{۱۰} و کیت TruSeq انجام شد. داده‌های خام تولید شده با نرم‌افزارهای FastQC و Trimmomatic کنترل شده، توالی‌های آداپتور از خوانش‌ها حذف و توالی‌های با کیفیت پایین یا دارای بازهای ناشناخته بیش از ۵ درصد طول خوانش، فیلتر شدند و به این ترتیب خوانش‌های با کیفیت بالا به دست آمد (Bolger 2014). به دلیل عدم وجود ژنوم مرجع برای گیاه اسطوخودوس، سرهم بندی داده‌ها با استفاده از اسمبلرهای Trinity، SPAdes، BinPacker و Bridger انجام شد و در نهایت روش Evidentialgene جهت اسمبل کردن نتایج RNA-Seq به کار گرفته شد (Gilbert 2016). خوانش‌های با کیفیت بالا هم‌ردیف شده و فراوانی خوانش‌های نقشه‌یابی شده روی یک رونوشت خاص با کمک نرم‌افزار RSEM تخمین زده شد (Li & Dewey 2011). میزان بیان هر رونوشت براساس شاخص FPKM^{۱۱} محاسبه شد (Mortazavi et al. 2008). ژن‌های دارای بیان افتراقی (DEG) بین تیمارها براساس $FDR \leq 0.001$ و $\log_2 \text{Ratio} \geq 2$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. جهت شناسایی توالی‌ها و تفسیر عملکرد ژن‌ها، جستجوی شباهت توسط برنامه BLASTN و با اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی NCBI (non-redundant (NR) صورت پذیرفت. آنالیز غنی‌سازی GO با نرم‌افزار AgriGO و آنالیز غنی‌سازی مسیرهای DEG از طریق نرم‌افزار KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome) صورت پذیرفت.

5. Qiagen RNeasy
6. NanoDrop1000
7. RNA Integrity Number
8. Bioanalyzer Agilent 2100
9. BGI-Hong Kong NGS Lab, <https://en.genomics.cn>
10. Illumina HiSeq 2000
11. Fragments per Kilobase transcriptome per Million mapped reads
12. False Discovery Rate

نتایج و بحث

با توجه به اینکه هدف از این تحقیق ارزیابی ترانسکریپتوم گیاه دارویی اسطوخودوس انگلیسی پس از اعمال تنش خشکی از طریق فن آوری RNA-Seq بود، جهت انتخاب بهترین تیمار خشکی فعالیت برخی از مهمترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان دخیل در پاسخ به خشکی، محتوای مالون‌دالدهید گیاه به عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدها و محتوای دی‌تیروزین به عنوان نشانه‌ای از اکسیداسیون پروتئین‌ها در برابر درجات مختلف کم‌آبی اندازه‌گیری و مقایسه شد (جدول ۱).

یافته‌ها نشان داد که تنش ملایم ۸۰ درصد ظرفیت زراعی بر روی محتوای مالون‌دالدهید و دی‌تیروزین اسطوخودوس انگلیسی تاثیر معنی‌دار ندارد و از آنجا که این دو شاخص نشانه‌ای از آسیب‌های سلولی ناشی از تنش هستند، می‌توان نتیجه گرفت که این گیاه در شرایط تنش ملایم همچنان به روند طبیعی عملکردی خود ادامه داد اما در تنش‌های متوسط تا شدید افزایش معنی‌دار داشت. آنزیم‌های گلوکاتایون‌رداکتاز و آسکوربات‌پراکسیداز نیز در گیاهان تحت تنش ۸۰ درصد هنوز افزایش فعالیت معنی‌دار نداشتند اما آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز و پیروکسیداز ۵-کربوکسیلات‌رداکتاز جهت مقابله با تنش شروع به افزایش کردند. در تنش متوسط ۶۰ درصد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اندازه‌گیری شده در این مطالعه به بالاترین مقدار خود رسیدند. در گیاهان تحت تنش شدید ۴۰ درصد، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاهش فعالیت نشان دادند و مقادیر مالون‌دالدهید و دی‌تیروزین به بالاترین سطح خود رسیدند که نشانه آسیب گیاه در مقابل این شدت از خشکی است. با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز بیوشیمیایی، تیمار ۶۰ درصد ظرفیت زراعی تنش کم‌آبی جهت مقایسه ترانسکریپتوم با گیاهان شاهد انتخاب شد. چهار کتابخانه cDNA از mRNAهای استخراج شده از برگ و گل گیاهان شاهد و تحت تنش خشکی اسطوخودوس انگلیسی تهیه شد.

جدول ۱. مقایسه میانگین آنزیم‌های سوپراکسیددسموتاز، گلوکوتایونرداکتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پیرولین-۵-کربوکسیلاترداکتاز و مالون‌دال‌دئید و دی‌تیروزین تحت اعمال تیمارهای مختلف آبیاری

Table 1. Mean comparison of SOD (Superoxide dismutase), GR (Glutathione reductase), CAT (Catalase), APX (Ascorbate peroxidase), P5CR (pyrroline-5-carboxylate reductase) and Malondialdehyde and Dityrosin activity under different irrigation treatment

میزان آبیاری (ظرفیت زراعی)	سوپراکسیددسموتاز	گلوکوتایونرداکتاز	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز
Irrigation (Filed capacity)	SOD (IU/gr Fw)	GR(IU/gr Fw)	CAT(IU/gr Fw)	APX(IU/gr Fw)
100%	2.62c	1.82b	3.21c	0.92c
80%	3.05b	1.96b	3.86b	0.98c
60%	3.78a	2.30a	4.53a	1.77a
40%	2.21d	1.35c	3.52bc	1.42b

میزان آبیاری (ظرفیت زراعی)	پیرولین-۵-کربوکسیلاترداکتاز	مالون‌دی‌آلدئید	دی‌تیروزین
Irrigation (Filed capacity)	P5CR(IU/gr Fw)	Malondialdehyde (micro Mol/gr Fw)	Dityrosin (nano mol/gr Fw)
100%	7.30c	4.26c	2.51c
80%	8.12b	5.11c	2.69c
60%	9.51a	9.72b	3.12b
40%	8.74b	13.40a	3.74a

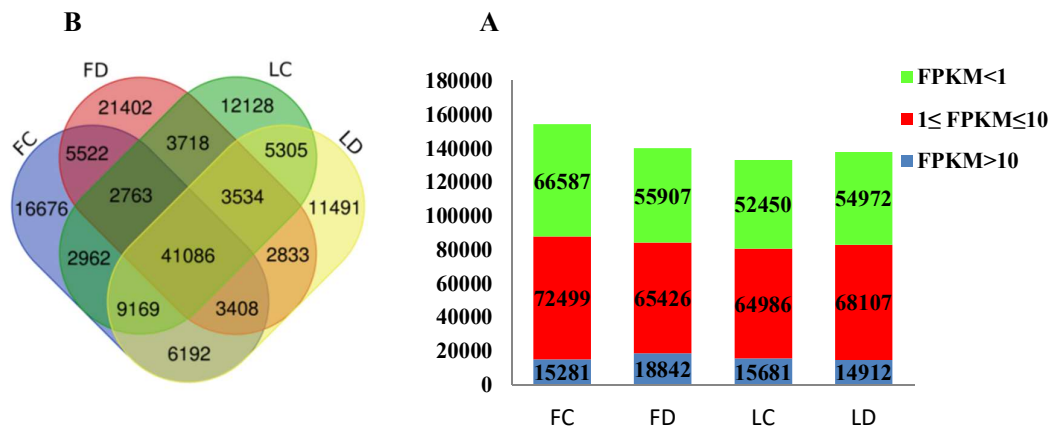
حروف مشترک در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد براساس مقایسه میانگین با آزمون LSD (حداقل اختلاف معنی‌دار) است.

Means within a column followed by the same letter are not significantly different at level of 5%.

الگوی رونوشت‌های برگ و گل گیاهان شاهد و تحت تنش با استفاده از توالی‌یاب Illumina genome Analyzer به دست آمد. به دلیل عدم وجود ژنوم مرجع اسطوخودوس از روش *de novo* و نرم‌افزارهای Trinity, BinPacker, SPAdes و Bridger جهت سرهم بندی داده‌ها و در نهایت از نرم‌افزار Evidentialgene استفاده شد. مجموعه به‌دست آمده از روش Evidentialgene که برآیندی از نتایج دیگر اسمبلرها است، صحت بیشتری از یکایک اسمبلرها دارد و جامعتر است (Nakasugi et al. 2014; Gilbert 2016). درصد GC در این تحقیق با روش Evidentialgene به ۴۴/۳۷ درصد رسید. GC به دست آمده در این تحقیق تقریباً برابر با نتایج به دست آمده در نعنای، درصد (۴۳/۱۴) (Jin et al. 2014)، سنجد، ۴۱/۸ درصد (Ye et al. 2018)، زیره سبز، ۴۱/۵ درصد (Sadeghi et al. 2017)، موسیر، ۴۳/۸۶ درصد (Zhou et al. 2015) است و از برخی دیگر از تحقیقات انجام شده مثل رقم Maillette اسطوخودوس ۳۸/۱ درصد (Malli et al. 2018) و جنتیان

۳۹/۷ درصد (Zhang et al. 2015)، بیشتر است. میزان N50(bp) در این مطالعه ۱۶۵۵ جفت باز بود و به عنوان معیار کیفیت سرهم بندی در مقایسه با سایر تحقیقات مناسب تشخیص داده شد. N50 در مریم گلی، ۱۶۰۳ (Ali et al. 2018)، نعناع، ۱۷۷۴ (Jin et al. 2014) و بادام، ۱۵۵۸ (Shiran et al. 2015) بود.

مقدار BUSCO^{۱۳} به عنوان مقیاس کمی برای سنجش کیفیت و تمامیت ژنوم با در نظر گرفتن ۱۴۴۰ گروه BUSCO به کار گرفته شد (Simao et al. 2015). BUSCO در این تحقیق بیانگر کیفیت بالای سرهم بندی‌ها بود بطوریکه به عدد ۹۲/۲ درصد رسید که این مقدار از بسیاری از تحقیقات مشابه بیشتر بود. به عنوان مثال در رقم Maillette اسطوخودوس میزان BUSCO، ۹۱/۸ درصد (Malli et al. 2018)، نعناع ۷۱ درصد (vining et al. 2017) و در ذرت با وجود ژنوم مرجع ۹۲ درصد بود (Schnable et al. 2009). در نهایت تعداد ۲۶۴۱۲۵ رونوشت حاصل شد و فراوانی رونوشت‌ها براساس شاخص FPKM محاسبه شد. تعداد این رونوشت‌ها برای هر یک از تیمارهای برگ شاهد، برگ خشکی، گل شاهد، گل خشکی و بر اساس $FPKM > 10$ ، $1 \leq FPKM \leq 10$ و $FPKM < 1$ دسته‌بندی شد (شکل ۱A). در شکل ۱B نمودار ون رونوشت‌های مشترک و اختصاصی در هر تیمار که FPKM بزرگتر از یک داشتند، آورده شده است. در این تحقیق ۱۶۶۷۶ رونوشت به طور اختصاصی در گل شاهد، ۲۱۴۰۲ رونوشت اختصاصی در گل تحت تیمار خشکی، ۱۲۱۲۸ رونوشت اختصاصی در برگ شاهد و ۱۱۴۹۱ رونوشت اختصاصی در برگ خشکی تشخیص داده شد ضمن اینکه ۴۱۸۰۶ رونوشت در تمامی تیمارها به طور مشترک بیان شدند. دو مقایسه برگ شاهد و برگ خشکی، گل شاهد و گل خشکی در این مطالعه انجام شد. ژن‌های دارای بیان افتراقی براساس $FDR < 0.01$ و $\log_2 \text{Ratio} > 2$ ، معنی‌دار در نظر گرفته شد. تعداد ۱۰۸۳ ژن با بیان افتراقی بین تیمار شاهد و خشکی گل مشاهده شد. از این تعداد ۸۱۹ ژن با اعمال خشکی افزایش بیان معنی‌دار و ۲۶۴ ژن کاهش بیان معنی‌دار نشان دادند. در مقایسه بین برگ شاهد و خشکی ۱۵۰ ژن بیان افتراقی داشتند که ۶۵ ژن افزایش و ۸۵ ژن کاهش بیان معنی‌دار داشتند. بررسی انتولوژی ژن‌های دارای بیان افتراقی توسط سایت AgriGO و در سه گروه فرآیندهای بیولوژیکی، اجزای سلولی و کارکرد مولکولی انجام گرفت. در مقایسه بین گل شاهد و خشکی ۳۶۱۷ مورد GO غنی شده و معنی‌دار ملاحظه شد که ۲۶۸۵ مورد مربوط به DEG-های افزایش بیان یافته تحت تنش خشکی و ۹۳۲ مورد مربوط به DEG‌های کاهش بیان یافته تحت تنش خشکی بود.

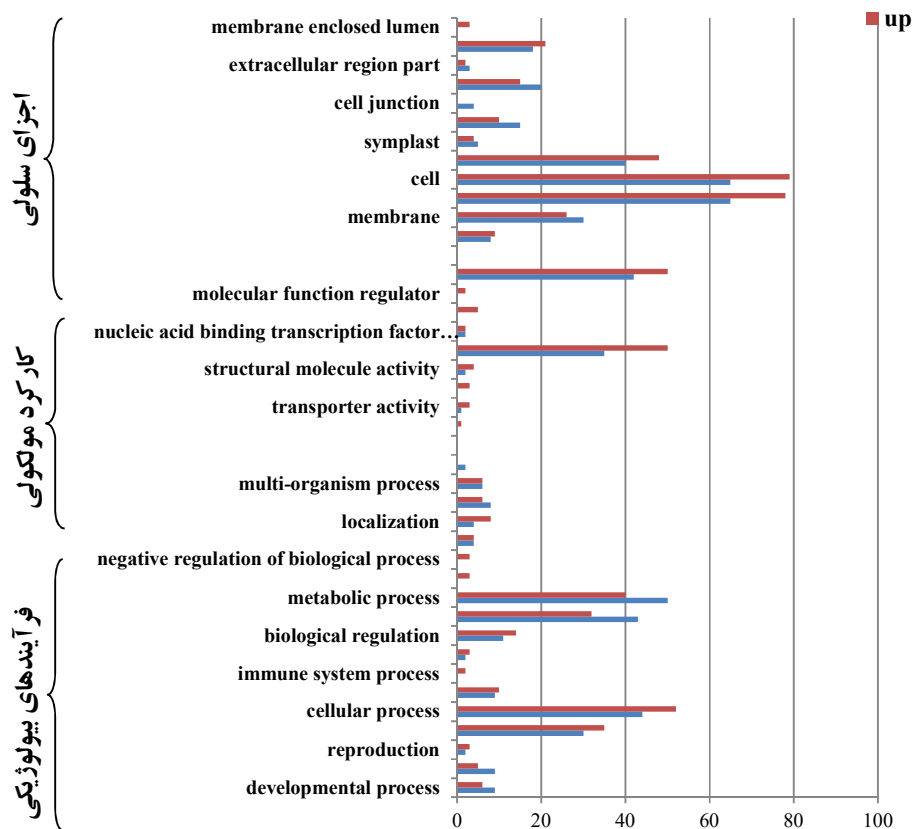


شکل ۱. A دسته‌بندی رونوشت‌های بیان شده برحسب مقدار بیان براساس شاخص FPKM. B نمودار ون رونوشت‌های بیان شده با FPKM بیشتر از یک. FC: گل شاهد، FD: گل خشکی، LC: برگ شاهد، LD: برگ خشکی

Figure 1. A classification of expressed transcripts based on FPKM value. B Venn diagram of 4 set data of transcripts with FPKM more than 1. FC: flower control, FD: flower drought, LC: leaf control, LD: leaf drought

در بین ژن‌های دارای بیان افتراقی معنی‌دار بافت گل، بیشترین درصد GOهای غنی شده در دسته‌بندی فرآیندهای بیولوژیکی مربوط به فرآیندهای سلولی (GO:0009987)، پاسخ به محرک‌ها (GO:0050896)، فرآیندهای متابولیسمی (GO:0008152)، فرآیندهای تک‌ارگانسیم (GO:0044699)، تنظیم بیولوژیکی (GO:0065007) و تنظیم فرآیندهای بیولوژیکی (GO:0050789) بودند. در این میان زیرگروه‌های فرآیندهای سلولی، پاسخ به محرک‌ها، تنظیم بیولوژیکی و تنظیم فرآیندهای بیولوژیکی با اعمال خشکی افزایش داشتند. در دسته کارکرد مولکولی، عملکرد کاتالیتیکی (GO:0003824) و بایندینگ (GO:0005488) بیشترین GOهای غنی شده بودند که سطح هر دو مورد با خشکی افزایش یافت. در دسته اجزای سلولی، سلول (GO:0005623)، جز سلولی (GO:0044464)، ارگانل (GO:0043226)، غشاء (GO:0016020)، جز ارگانل (GO:0044422) و جز غشایی (GO:0044425) با بیشترین تعداد ژن غنی شدند (شکل ۲).

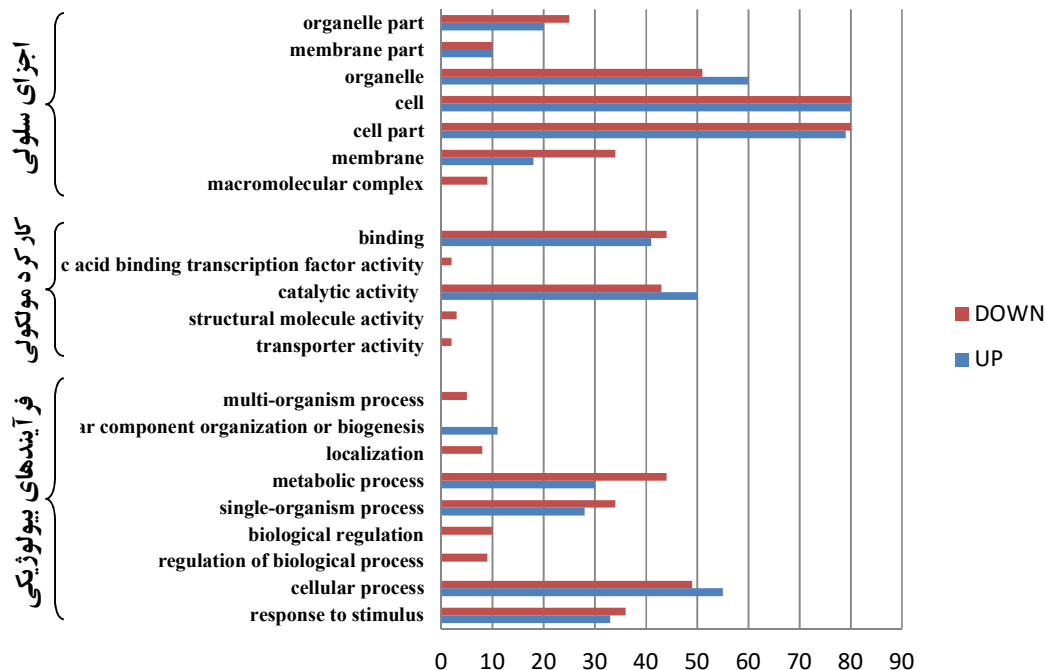
در DEGهای افزایش بیان یافته تحت تنش خشکی در برگ، تعداد ۱۸۲ مورد GO و در DEGهای کاهش بیان یافته تحت تنش خشکی در برگ، تعداد ۳۳۱ مورد GO غنی گشت. فرآیندهای سلولی (GO:0009987)، فرآیندهای متابولیسمی (GO:0008152)، پاسخ به محرک‌ها (GO:0050896)، و فرآیندهای تک‌ارگانسیم (GO:0044699) بیشترین GOهای غنی شده در دسته فرآیندهای بیولوژیکی بودند.



شکل ۲. آنالیز غنی‌سازی GO ژن‌های دارای بیان افتراقی تحت تنش خشکی در بافت گل. محور افقی، درصد ژن‌های هر زیرگروه و محور عمودی عناوین زیرگروه‌ها هستند.

Figure 2. GO enrichment analysis of DEGs identified in flowers under drought stress. The percent of genes in a specific sub-category is shown on the x-axis. the name of the sub-category is shown on the y-axis.

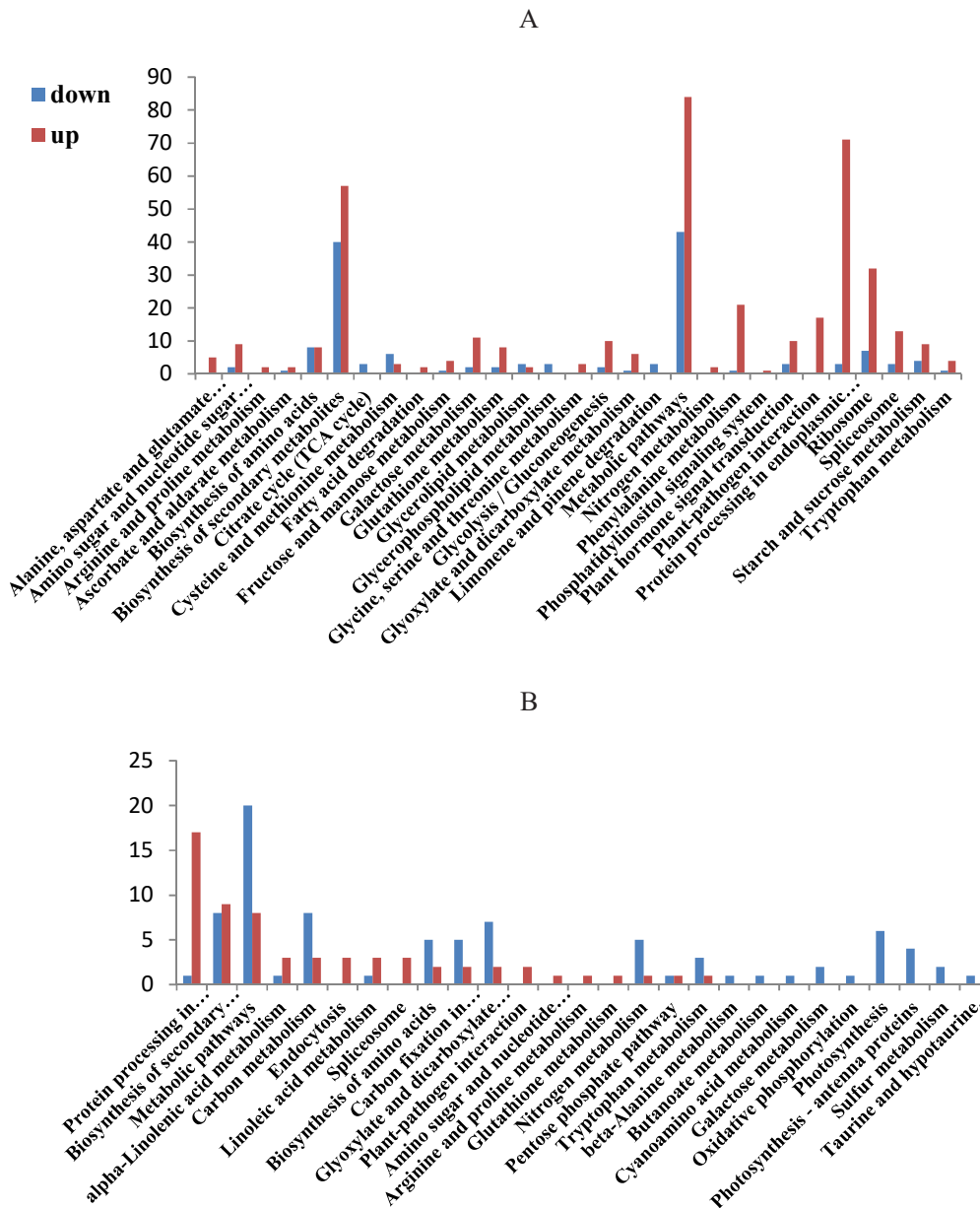
بر خلاف بافت گل، در برگ فرآیندهای سلولی در اثر خشکی کاهش و فرآیندهای متابولیکی و فرآیندهای تک‌ارگانسیم افزایش داشتند. در برگ و گل پاسخ به محرک‌ها تحت تنش افزایش داشتند. در دسته کارکرد مولکولی همانند بافت گل، عملکرد کاتالیتیکی (GO:0003824) و بایندینگ (GO:0005488) بیشترین GOهای غنی شده بودند. بایندینگ مانند بافت گل با خشکی افزایش یافت اما فعالیت کاتالیتیکی برخلاف گل کاهش داشت. مشابه بافت گل، سلول (GO:0005623)، جز سلولی (GO:0044464)، ارگانل (GO:0043226)، غشاء (GO:0016020)، جز ارگانل (GO:0044422) و جز غشایی (GO:0044425) در دسته اجزای سلولی با بیشترین تعداد ژن غنی شدند (شکل ۳).



شکل ۳. آنالیز غنی‌سازی GO ژن‌های دارای بیان افتراقی تحت تنش خشکی در بافت برگ. محور افقی، درصد ژن‌های هر زیرگروه و محور عمودی عناوین زیرگروه‌ها هستند.

Figure 3. GO enrichment analysis of DEGs identified in leaf under drought stress. The percent of genes in a specific sub-category is shown on the x-axis. The name of the sub-category is shown on the y-axis.

آنالیز مسیرهای غنی‌سازی DEGs با استفاده از Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) انجام شد (شکل ۴). این آنالیز امکان تشخیص مسیرهای متابولیکی غنی شده یا مسیرهای انتقال سیگنال را در DEGs می‌دهد. تحمل به تنش خشکی فرآیندی چندژنی است و مسیرهای متابولیکی مختلف را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Mehta et al. 2017). غنی‌ترین مسیرهای متابولیکی در گل شامل مسیرهای متابولیکی با ۴۳ ژن در شاهد و ۸۴ ژن در خشکی، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه با ۴۰ ژن در شاهد و ۵۷ ژن در خشکی، پردازش پروتئین در شبکه اندوپلاسمی با سه ژن در شاهد و ۷۱ ژن در خشکی و مسیر ریوزوم با هفت ژن در شاهد و ۳۲ ژن در خشکی بود.



شکل ۴. آنالیز مسیرهای متابولیکی KEGG ژن‌های دارای بیان افتراقی تحت تنش خشکی A: بافت گل، B:

بافت برگ. تعداد ژن‌های دخیل در هر مسیر روی محور y و مسیرها روی محور x نشان داده شده است.

Figure4. KEGG significantly metabolic pathways in the flower (A) and leaf (B) obtained under the drought stress. The number of genes involve in each pathway is shown on the y-axis. The name of the pathways is shown on the x-axis.

در بافت برگ نیز مسیر پردازش پروتئین در شبکه اندوپلاسمی با یک ژن در شاهد و هفده ژن در خشکی، بیوستتیز متابولیت‌های ثانویه با هشت ژن در شاهد و نه ژن در خشکی و مسیرهای متابولیکی با بیست ژن در شاهد و هشت ژن در خشکی غنی‌ترین مسیرهای شناسایی شده برای DEG‌های معنی‌دار در این مطالعه بودند.

قرارگیری گیاهان در معرض تنش خشکی به تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) شامل رادیکال‌های آنیون سوپراکسید (O_2^-)، هیدروکسیل (OH)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، آلوکوسی (RO) و اکسیژن منفرد (O_2^1) منجر می‌شود (Munne- 2003). یکی از روش‌های مقابله گیاهان با کم‌آبی، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی است. مهمترین ترکیبات آنزیمی دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات‌پراکسیداز، پراکسی‌ردوکسین‌ها و گلوتاتیون ردکناز است (Gong et al. 2005). دو ژن مربوط به آنزیم آسکوربات پراکسیداز^{۱۴} در میان DEG‌های معنی‌دار در بافت گل شناسایی شد که در اثر خشکی افزایش بیان نشان دادند. یکی از این ژن‌ها در بافت گل ۲۷/۶ برابر و در بافت برگ ۴/۳ برابر و دیگری در بافت گل ۱۰/۸ برابر و در بافت برگ ۴/۱ برابر افزایش بیان داشتند. چرخه آسکوربات-گلوتاتیون مهمترین سیستم سم‌زدایی در کلروپلاست گیاهان است و آسکوربات پراکسیداز آنزیم کلیدی در این چرخه است که از آسکوربات به عنوان دهنده الکترون استفاده می‌کند و H_2O_2 را به آب احیا و به این وسیله از تنش اکسیداتیو جلوگیری می‌کند (Shigeoka et al. 2002). این تغییر بیان ژن با یافته‌های بیوشیمیایی در این مطالعه مطابقت دارد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با افزایش تنش تا سطح ۶۰ درصد ظرفیت زراعی به شکل معنی‌داری افزایش یافت. همان‌طور که در شکل ۴A نیز مشاهده می‌شود، آنالیز KEGG نشان داد مسیر متابولیسم اسپارتات-گلوتامات بین گل شاهد و خشکی معنی‌دار بود.

همچنین سه ژن آنزیم کاتالاز^{۱۵} در بافت گل افزایش ۵/۸، ۱۴/۹ و ۲۲/۱۱ برابر داشتند و یک ژن کاتالاز نیز در بافت برگ بیان ۷/۶ برابری داشت. فعالیت آنزیم کاتالاز با اعمال تنش آبیاری در سطح ۸۰ درصد نسبت به شاهد، افزایش معنی‌داری یافت و با افزایش شدت تنش تا سطح ۶۰ درصد به بالاترین سطح خود رسید. کاتالاز آنزیم تترامری دارنده هم است که در همه ارگانسیم‌های هوای وجود داشته و منجر به تخریب سریع H_2O_2 می‌شود. مقدار H_2O_2 سلولی به همراه سطوح دیگر ROS‌ها نشانه خوبی از میزان تنش اکسیداتیو در گیاه است و مقادیر آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز جهت مقابله با سطوح آسیب‌رسان H_2O_2 مهم هستند (Apel & Hirt 2004). شش ژن مربوط به سنتز آنزیم گلوتاتیون S-ترانسفراز^{۱۶} در بافت گل و دو ژن در بافت برگ افزایش بیان معنی‌دار داشتند. گلوتاتیون S-ترانسفراز آنزیمی است که با کمک گلوتاتیون گیاهان را از تنش‌های غیرزنده محافظت می‌کند. این آنزیم بین گروه تیول گلوتاتیون و سوبسترای اکسیدشده سمی اتصال برقرار می‌کند. این ترکیب نشانه‌گذاری شده در واکنش‌ها مصادره شده یا با کمک پمپ‌های غشایی وابسته به ATP از سلول خارج می‌شود (Kumar & Trivedi

14. L-ascorbate peroxidase (APX) (EC: 1.11.1.11)

15. Catalase (CAT) (EC :1.11.1.6)

16. Glutathione S-transferase (GST) (EC: 2.5.1.18)

2018). همان‌گونه که در شکل ۴A مشاهده می‌شود تعداد ژن‌های دخیل در مسیرهای متابولیسم گلوتاتیون در بافت گل با اعمال خشکی از دو به هشت ژن رسید. گلوتاتیون مهمترین کوفاکتور تیولی غیر پروتئینی آنزیم‌های سم‌زدای مختلف است که در واکنش‌های مختلف فیزیولوژیکی مثل انتقال سیگنال و بیان ژن‌های مقابله با تنش نقش دارد. ضمن اینکه شواهد بسیاری از همبستگی بین غلظت گلوتاتیون و توانایی گیاه به زنده ماندن تحت تنش اکسیداتیو وجود دارد. گلوتاتیون علاوه بر اینکه در سم‌زدایی از ROS در چرخه آسکوربات-گلوتاتیون نقش دارد، مانع از تخریب پروتئین‌هایی می‌شود که گروه تیول آنها در طی تنش اکسید شده است. این عملکرد با اکسیداسیون گلوتاتیون (GSH) به دی‌سولفیدگلوتاتیون (GSSH) انجام می‌شود. نرخ گلوتاتیون به دی‌سولفیدگلوتاتیون توسط گلوتاتیون رداکتاز کنترل می‌شود که از یک NADPH جهت احیا دی‌سولفیدگلوتاتیون به دو گلوتاتیون استفاده می‌کند. علاوه بر این GSH در واکنش‌های مربوط به گلوتاتیون پراکسیداز عمل می‌کند (Noctor et al. 2012).

ژن کدکننده آنزیم دلتا-۱-پیرولین-۵-کربوکسیلات سینتاز^{۱۷} در اثر تنش به بیان ۱/۵ برابری در بافت گل رسید. آنزیم‌های پیرولین-۵-کربوکسیلات سینتاز و پیرولین-۵-کربوکسیلات رداکتاز آنزیم‌های کلیدی در مسیر سنتز پیرولین از گلوتامات هستند. به منظور محافظت از غشاء سلول و فراهم آوردن محیط مطلوب برای عملکرد اجزای سلولی، گیاهان مکانیسم‌های متفاوتی جهت کنترل ورود و خروج آب و تنظیم فشار اسمزی دارند. یکی از این راهکارها سنتز مواد محلول سازگار یا اسمولایت‌ها است. پیرولین در نقش محلول سازگار، واسطه‌ی ذخیره‌ی کربن و نیتروژن، غربالگر ROS، چارپرون مولکولی جهت پایدار نگه داشتن ساختار پروتئین‌ها، تنظیم کننده pH سیتوسولی و عامل ایجاد تعادل در سیستم سم‌زدایی سلول فعالیت دارد (Verbruggen & Hermans 2008). در این تحقیق آنزیم پیرولین-۵-کربوکسیلات سینتاز با اعمال تنش آبیاری در سطح ۸۰ درصد نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد و با افزایش شدت تنش در سطح ۶۰ درصد به بالاترین سطح فعالیت خود رسید. در آنالیز مسیر KEGG نیز تعداد ژن‌های دخیل در متابولیسم پیرولین افزایش داشت (شکل ۴).

نقش فیزیولوژیکی سوپراکسیددسموتازها^{۱۸} محافظت از سلول در برابر رادیکال‌های سوپراکسید در زمان مواجهه با تنش خشکی، شوری، سرما و غیره است. مولکول‌های سوپراکسید (O_2^-) به جایگاه فعال آنزیم که در اثر آرایش خاص اسیدهای آمینه دارای بار مثبت است، جذب می‌شوند. کوفاکتور فلزی حاضر در جایگاه فعال، مستقیماً یک الکترون به O_2^- داده و آن را احیا می‌کند که در ترکیب با یک پروتون، پراکسید هیدروژن را شکل می‌دهد. فعالیت سوپراکسیددسموتاز طی تنش‌ها افزایش یافته و تحمل به تنش اکسیداتیو در گیاه ایجاد می‌کند (Pan et al. 2006). در این مطالعه دو ژن کدکننده آنزیم سوپراکسیددسموتاز افزایش بیان ۱۲/۲ و ۸/۵ برابری در نتیجه اعمال تنش خشکی داشتند. هورمون‌های گیاهی در رشد و نمو گیاه و واکنش به تنش‌های زنده و غیرزنده نقش دارند. همپوشانی و تقابلات مسیرهای تنظیمی توسط هورمون‌ها، شبکه پیچیده‌ای از ارتباطات تقاطعی بین مسیرهای

17. Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS) (EC: 2.7.2.11)

18. Superoxide dismutase (SOD) (EC: 1.15.1.1)

سیگنال‌رسانی هورمونی را در طی سازگاری به خشکی نشان می‌دهد (Peleg & Blumwald 2011). آبسزیک اسید هورمونی کلیدی در گیاهان است و بعنوان یک پیام‌رسان، در پاسخ به تنش‌های خشکی و سایر تنش‌های محیطی و نیز در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی از قبیل فتوسنتز، تنظیم باز و بسته شدن روزنه‌ها و پیری نقش دارد (Liu et al. 2018). در این تحقیق نوزده ژن دارای بیان افتراقی معنی‌دار در بافت گل و چهار ژن در بافت برگ بیان وابسته به ABA داشتند. از جمله ژن PYL9^{۱۹} که گیرنده کلیدی آبسزیک اسید است و در پاسخ‌های وابسته به آبسزیک اسید مثل بستن روزنه‌ها و پیری دخیل است و حساسیت به آبسزیک اسید را در زمان تنش خشکی بالا می‌برد. پروتئین‌های (PYL, PYR, PCAR) با دومین START گیرنده-های آسید آبسزیک هستند. PYLها به آبسزیک اسید متصل می‌شوند که ظرفیت این اتصال در حضور PP2Cها، پروتئین فسفاتازهای 2C مثل ABI1, ABI2, HAB1 و PP2CA، حدود ۱۰۰ برابر می‌شود. این وقایع منجر به آزادسازی SnRK2ها از PP2Cها، فسفریلاسیون آنها و القاء واکنش‌های پایین دست می‌شود (Fujii & Zhu 2009). بر اساس آنالیز KEGG تعداد ژن‌هایی که مستقیماً در انتقال سیگنال هورمونی گیاه در این مطالعه دخیل بودند با اعمال خشکی از سه عدد به ده عدد رسیدند (شکل ۴).

فسفریلاسیون پروتئین، هسته مرکزی سیگنال‌رسانی سلول در پاسخ به تنش‌ها است. گیاهان انواع مختلفی از پروتئین کینازها را در پاسخ به محرک‌های خارجی از جمله تنش خشکی توسعه داده‌اند. از جمله کینازهای مرتبط با SNF1^{۲۰} که نقش مهمی در انتقال سیگنال‌های خشکی ایفا می‌کنند (Hirayama & Shinozaki 2010). این گروه از کینازها از خانواده سرین/تروئین پروتئین کینازها^{۲۱} هستند که تنظیم کننده‌های مثبت و محوری مسیرهای سیگنال‌رسانی ABA هستند. یک ژن کدکننده SNRK^{۲۲} در این مطالعه شناسایی شد که تحت تنش خشکی به شش برابر بیان گیاهان شاهد رسید. هیستیدین کینازها^{۲۳} از دیگر پروتئین کینازها هستند که از طریق فسفریلاسیون هیستیدین-آسپاراتات، بسیاری از پروسه‌های فیزیولوژیکی و نمو گیاه را کنترل می‌کنند. هیستیدین کینازها همچنین به عنوان حس کننده‌های اسمزی در زمان بروز تنش عمل کرده و بین هورمون‌ها و آبشارهای پاسخ به استرس ارتباط برقرار می‌کند (Nongpiur et al. 2012). سه ژن هیستیدین کیناز در بافت گل افزایش بیان ۶/۵، ۱۱/۹ و ۱۳/۴ و یک ژن در بافت برگ افزایش ۶/۳ برابری داشت.

پروتئین‌های LEA^{۲۴} (پروتئین‌های وافر در اواخر دوره جنین‌زایی) گروه مهم دیگری از پروتئین‌های تنش هستند که هم در شرایط تنش خشکی و هم تنش سرمایی افزایش می‌یابند (Tunnacliffe & Wise 2007). این پروتئین‌ها ظرفیت اتصال به آب را افزایش داده و محیطی امن برای فعالیت پروتئین‌ها فراهم می‌کنند. این پروتئین‌ها همچنین در جداسازی یون‌های انباشته

19. Abscisic acid Receptor PYL9

20. Sucrose Non Fermentation

21. Serine/Threonine protein kinase

22. SNF1 related kinase (EC: 2.7.11.1)

23. Histidine kinase (HK) (EC: 2.7.13.3)

24. Late embryogenesis abundant protein

شده در طی آب کشیدگی سلول‌ها نقش دارند (Gorantla et al. 2006). شش ژن LEA در پی بروز خشکی در بافت گل افزایش و دو ژن کاهش بیان داشتند. در بافت برگ نیز یک ژن افزایش بیان و یک ژن نیز کاهش بیان نشان داد. آکوپورین‌ها^{۲۵} پروتئین‌های غشایی ویژه‌ای هستند که ورود و خروج آب را از غشاهای گیاهی تسهیل می‌کنند. مطالعات بسیاری ارتباط بین آکوپورین‌ها و محتوی آب سلول‌ها را تایید کرده است (Javot & Maurel 2002). در این مطالعه با اعمال خشکی پنج ژن سنتز پروتئین آکوپورین افزایش بیان داشتند. آکوپورین‌ها به خانواده محافظت شده‌ای از پروتئین‌های غشایی مهم تعلق دارند. آکوپورین‌ها هدایت آب بین غشاهای را کنترل کرده و پتانسیل افزایش حدود ده برابری تراوایی آب را دارند (Maurel & Chrispeels 2001). در میان پنج ژن شناسایی شده آکوپورین در این مطالعه، سه ژن از نوع پروتئین‌های اصلی غشای پلاسما^{۲۶} و دو ژن دیگر از نوع پروتئین‌های اصلی غشای تونوپلاست^{۲۷} بوده‌اند. مسیر گلیکولیز/گلوکونئوزیز از مسیرهای متابولیسم اولیه است که در پاسخ به خشکی تنظیم و بیان می‌شوند. آنالیز مسیر KEGG افزایش قابل توجه در تعداد ژن‌های دخیل در این مسیر را در نتیجه خشکی نشان داد. هگزوکیناز^{۲۸} از جمله آنزیم‌های مهم دخیل در این مسیر است که در تنظیم سطح سلولی گلوکز و فروکتوز تاثیرگذار است. افزایش سطح گلوکز و فروکتوز در فازهای اولیه حس کم‌آبی صورت می‌پذیرد (Pan et al. 2016). دو ژن هگزوکیناز در بافت گل افزایش بیان معنی‌دار داشتند. ژن مهم دیگر دخیل در این مسیر گلوکز ۶-فسفات ایزومراز^{۲۹} با افزایش بیش از شش برابر بود. لیپیدها از اجرای مهم غشایی هستند که جهت کمک به تمامیت غشا و حفظ سلول تحت کم‌آبی تغییر می‌کنند. محتوای لیپیدهای غشا در گیاهان در معرض تنش آبی کاهش می‌یابد (Gigon et al. 2004). تعداد سه ژن مرتبط با مسیرهای متابولیسم گلیسروفسفولیپید در این تحقیق با اعمال خشکی بازداشته شدند. این سه ژن کد کننده گلیسرول ۳-فسفات اسیل ترانسفراز^{۳۰} هستند که در گیاهان شاهد بیان معنی‌دار داشتند اما در گیاهان تحت تنش خشکی بازداشته شدند.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر برای اولین بار از تکنیک RNA-Seq جهت بررسی پاسخ ترانسکریپتوم اسطوخودوس انگلیسی به تنش خشکی استفاده شد. ژن‌های دارای بیان افتراقی پاسخ دهنده به خشکی در بافت برگ و گل شناسایی شدند که عمدتاً شامل ژن‌های کد کننده آنتی‌اکسیدانت‌ها، ژن‌های درگیر در مسیر پاسخ‌دهی اسید آسبیزیک و فسفریلاسیون پروتئین بودند. آنالیز GO و KEGG ژن‌ها و مسیرهای پاسخ‌دهی مهمی را که مرتبط با خشکی هستند، شناسایی نمود. نتایج این تحقیق نقش بسیاری از ژن‌هایی را که در اثر تنش خشکی فعال می‌شوند، برای اولین بار در اسطوخودوس شناسایی و پررنگ نمود. لذا از نتیجه این تحقیق می‌توان جهت اصلاح و بهبود این گیاه ارزشمند که جانشین مناسبی جهت استفاده در شرایط کم‌آبی با دیگر گیاهان است، استفاده نمود.

25. Aquaporin (AQP)

26. Aquaporin PIP1-3

27. Aquaporin TIP3-1

28. Hexokinase (HXK) (EC: 2.7.1.1)

29. Glucose-6-phosphate isomerases (GPI) (EC: 5.3.1.9)

30. Glycerol-3-phosphate 2-O-acyltransferase (GPAT) (EC: 2.3.1.198)

منابع

- توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئی علی، نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت‌های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۶(۴)، ۵۰-۳۵.
- توکلی نکو حسین، حاجی میررحیمی سیدداوود، مرادی محمدرضا (۱۳۹۵) بسته‌ی کارآفرینی کشت و پرورش اسطوخودوس. چاپ اول، انتشارات اسرار علم، ۱۷-۱۸.
- جعفری دره‌در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئی علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان ۴(۴)، ۱۳۲-۱۱۹.
- شهبابی امین، طهمورث‌پور مجتبی، کاظمی‌پور علی (۱۳۹۸) بازسازی، آنالیز و مقایسه توپولوژی شبکه ژنی مبتنی بر داده‌های RNA-Seq دخیل در صفات چند فاکتوره تولید مثلی و باروری. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱(۲)، ۷۸-۵۷.
- صادقی داریوش، مرتضویان سید محمد مهدی، بختیاری زاده محمدرضا (۱۳۹۷) ارزیابی توالی رونوشت گیاه دارویی زیره سبز (*Cuminum cyminum*) با استفاده از RNA-Seq. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۹(۴)، ۱۱۶-۱۰۱.
- علی‌سلطانی ارغوان، شیران بهروز، ابراهیمی اسماعیل و همکاران (۱۳۹۴) الگوی بیان ژن‌های مرتبط با فرایند متابولیک ماکرومولکول‌ها تحت تنش سرما در بادام (*Prunus dulcis* Mill) از طریق تجزیه RNA-seq. ژنتیک نوین ۱۰(۱)، ۲۱-۳۲.

References

- Adal AM, Sarker LS, Malli RPN et al. (2019) RNA-Seq in the discovery of a sparsely expressed scent-determining monoterpene synthase in lavender (*Lavandula*). *Planta* 249(1), 271-290.
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121-126.
- Ali M, Hussain RM, Rehman NU et al. (2018) De novo transcriptome sequencing and metabolite profiling analyses reveal the complex metabolic genes involved in terpenoid biosynthesis in Blue Anise Sage (*Salvia guaranitica* L.). *Dna Res* 25(6), 597-617.
- AliSoltani A, Shiran B, Ebrahimi E et al. (2015) Expression of genes related to macromolecule metabolic process under cold stress in almond (*Prunus dulcis* Mill) using RNA-seq analysis. *Mod Genet J* 10, 21-32 (In Persian).
- Amado R, Aeschbach R, Neukom H (1984) Dityrosine: in vitro production and characterization. *Methods Enzymol* 107, 377-388.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55, 373-399.

- Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidant system in plants. *Plant Physiol* 82, 1227-1237.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinform* 30, 2114-2120.
- Brady JD, Fry SC (1997) Formation of Di-Isodityrosine and Loss of Isodityrosine in the cell walls of tomato cell-suspension cultures treated with Fungal Elicitors. *Plant Physiol* 115, 87-92.
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003) Understanding plant response to drought-from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol* 30, 239-264.
- Dugas DV, Monaco MK, Olsen A et al. (2011) Functional annotation of the transcriptome of *Sorghum bicolor* in response to osmotic stress and abscisic acid. *Bmc Genomics* 12, 514.
- Feller U, Vaseva II (2014) Extreme climatic events: Impacts of drought and high temperature on physiological processes in agronomically important plants. *Front Environ Sci* 2, 39.
- Fujii H, Zhu JK (2009) Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proc Natl Acad Sci* 106, 8380-8385.
- Gigon A, Matos AR, Laffray D et al. (2004) Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *Ann Bot* 94, 345-351.
- Gilbert D (2016) Accurate & complete gene construction with EvidentialGene. *Galaxy Community Conference* Bloomington. <https://doi.org/10.7490/fl000research.1112467.1>
- Gong H, Zhu X, Chen K et al. (2005) Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Sci* 169, 313-321.
- Gorantla M, Babu PR, Lachagari VBR et al. (2006) Identification of stress responsive genes in an indica rice (*Oryza sativa* L.) using ESTs generated from drought-stressed seedlings. *J Exp Bot* 58, 253-265.
- Hirayama T, Shinozaki K (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J* 61, 1041-1052.
- Jafari Darehdor AH, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Riahi Madvar A (2016) Investigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time qPCR. *J Rumin Res* 4, 119-132 (In Persian).
- Javot H, Maurel C (2002) The role of aquaporins in root water uptake. *Ann Bot* 90, 301-313.
- Jin J, Panicker D, Wang Q et al. (2014) Next generation sequencing unravels the biosynthetic ability of Spearmint (*Mentha spicata*) peltate glandular trichomes through comparative transcriptomics. *Bmc Plant Biol* 14, 2-30.
- Kandpal Rajendra P, Vaidyanathan CS, Kumar Udaya M (1981) Alterations in the activities of

- the enzymes of proline metabolism in Ragi (*Eleusine coracana*) leaves during water stress. *J Biosci* 3(4), 361-370.
- Klute A. (1986) Water retention: Laboratory methods. *Methods of Soil Analysis, Part 1, Physical and Mineralogical Methods*, ASA and SSSA, Madison, 635-662.
- Kumar S, Trivedi PK (2018) Glutathione S-Transferases: Role in Combating Abiotic Stresses Including Arsenic Detoxification in Plants. *Front Plant Sci* 9, 751.
- Li B, Dewey C (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNASeq data with or without a reference genome. *Bmc bioinform* 12, 323.
- Li H, Li J, Dong Y et al. (2019) Time-series transcriptome provides insights into the gene regulation network involved in the volatile terpenoid metabolism during the flower development of lavender, *Bmc Plant Biol* 19, 313.
- Lis-Balchin M (2002) *Lavender: The Genus Lavandula* (1st edn), Taylor and Francis Inc., CRC Press, New York, pp. 1-2.
- Liu S, Lv Z, Liu Y et al. (2018) Network analysis of ABA-dependent and ABA-independent drought responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genet Mol Biol* 41(3), 624-637.
- Malli RPN, Adal AM, Sarker LS et al. (2018) De novo sequencing of the *Lavandula angustifolia* genome reveals highly duplicated and optimized features for essential oil production. *Planta* 249, 251-256.
- Maurel C, Chrispeels MJ (2001) Aquaporins: a molecular entry into plant water relations, *Plant Physiol* 125, 135-138.
- Mehta RH, Ponnuchamy M, Kumar J et al. (2017) Exploring drought stress-regulated genes in senna (*Cassia angustifolia* Vahl.): a transcriptomic approach. *Funct Integr Genomic* 17, 1-25.
- Min H, Chen C, Wei S (2016) Identification of drought tolerant mechanisms in maize seedlings based on transcriptome analysis of recombination inbred lines. *Front Plant Sci* 7, 1080.
- Minami M, Yoshikawa H (1979) A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clin Chim Acta* 92, 337-342.
- Mohammadabadi MR, Jafari Darehdor AH, Bordbar F (2017) Molecular analysis of CIB4 gene and protein in Kermani sheep. *Brazil J Med Biol Res* 50, e6177.
- Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Characteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. *Iran. J. Appl. Anim. Sci* 7 (2), 289-295.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 5, 621-628.
- Munne-Bosch S, Penuelas J (2003) Photo and antioxidative protection and a role for salicylic

- acid during drought and recovery field grown *Phillyrea angustifolia*. *Planta* 217, 758-766.
- Nakasugi K, Crowhurst R, Bally J, Waterhouse P (2014) Combining transcriptome assemblies from multiple de novo assemblers in the allo-tetraploid plant *Nicotiana benthamiana*. *Plos One* 9(3): e91776.
- Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S et al. (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Env* 35(2), 454-484.
- Nongpiur R, Soni P, Karan R et al. (2012) Histidine kinases in plants: cross talk between hormone and stress responses. *Plant Signal Behav* 7(10), 1230-1237.
- Nunes DS, Linck VM, Silva AL et al. (2015) Psychopharmacology of Essential Oils. In *Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications*. Eds. CRC Press, London, UK, pp. 297-314.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi Y (1979) Assay of lipid peroxides in tissues by thiobarbituric acid reaction. *Ann Biochem* 95, 351-358.
- Ozsolak F, Milos PM (2011) RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat Rev Genet* 12, 87-98.
- Pan L, Zhang X, Wang J et al (2016) Transcriptional Profiles of Drought-Related Genes in Metabolic Processes and Antioxidant Defenses in *Lolium multiflorum*. *Front Plant Sci* 7, 519.
- Pan Y, Wu LJ, Yu ZL (2006) Effect of salt and drought on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). *Plant Growth Regul* 49, 157-165.
- Peleg Z, Blumwald E (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr Opin Plant Biol* 14, 290-295.
- Sadeghi D, Mortazavian SMM, Bakhtyari Zadeh MR (2017) Transcriptome analysis of cumin (*Cuminum cyminum* L.) using RNA-Seq. *Agric Biotechnol J* 9, 101-116 (In Persian).
- Schnable PS, Ware D, Fulton RS et al. (2009) The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326, 1112-1115.
- Shahabi A, Tahmoorespur M, Kazemi-Pour A (2019) Reconstruction, analysis and comparison of gene networks topology based on RNA-Seq data involved in reproductive and fertility complex traits. *Agric Biotechnol J* 11, 57-78 (In Persian).
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J of Botany*, 1-26.
- Shelden MC, Roessner U (2013) Advances in functional genomics for investigating salinity stress tolerance mechanisms in cereals. *Front Plant Sci* 4, 123.

- Shigeoka S (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* 53, 1305-1319.
- Simao FA, Waterhouse RM, Ioannidis P et al. (2015) BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinform* 31, 3210-3212.
- Tavackoli nekoo H, Hajimir Rahimi SD, Moradi M (2017) Lavander growing Entrepreneurship package. Asrare Elm Press. Iran, pp 17-18 (In Persian).
- Tohidinejad F, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. *Agric Biotechnol J* 6, 35-50 (in Persian).
- Tunnacliffe A, Wise MJ (2007) The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften* 94, 791-812.
- Verbruggen N, Hermans C (2008) Proline accumulation in plants. *J. Amino Acids* 35, 753-759.
- Vining KJ, Johnson SR, Ahkami A et al. (2017) Draft Genome Sequence of *Mentha longifolia* and Development of Resources for Mint Cultivar Improvement. *Mol Plant* 10, 323-339.
- Wang SY, Jiao H, Faust M (1991) Changes in ascorbate, glutathione and related enzyme activities during thiodiazuron-induced bud break of apple. *Plant Physiol* 82, 231-236.
- Wu S, Ning F, Zhang Q et al. (2017) Enhancing omics research of crop responses to drought under field conditions. *Front Plant Sci* 8, 174.
- Ye G, Ma Y, Feng Z, Zhang X (2018) Transcriptomic analysis of drought stress responses of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis*) by RNA-Seq. *PLoS ONE* 13, e0202213.
- Zhang X, Allan AC, Li C (2015) *De Novo* Assembly and Characterization of the Transcriptome of the Chinese Medicinal Herb, *Gentiana rigescens*. *Int J Mol Sci* 16, 11550-11573.
- Zhou SM, Chen LM, Liu SQ et al. (2015) *De Novo* Assembly and Annotation of the Chinese Chive (*Allium tuberosum* Rottler ex Spr.) Transcriptome Using the Illumina Platform. *Plos One* 10, e0133312.

