ژنتیک نوین
دوره هجدهم، شماره ۲ تابستان ۱۴۰۲
صفحه ۲۱۰ - ۱۹۹

مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی نیم‌رخ بیان ژن گیاهچه‌های آرابیدوپسیس به‌منظور شناسایی ژن‌های کلیدی پاسخ‌دهنده به تنش گرما

Bioinformatics evaluation of the gene expression profile of *Arabidopsis* seedlings in order to identify heat stress responsive hob genes

مرضیه کیانی ده کیان[۱]، هنگامه طاهری*[۲]، آیه سادات صدر [۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

۲- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۳- استادیار، پژوهشکده آبزی پروری آب‌های جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

Kiani Deh Kian M [1], Taheri H*[2], Sadr AS[3]

1- MSc Student, in Agricultural biotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

2- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

3- Assistant Professor, South of Iran Aquaculture Research Institute (SIARI), Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Taheri@asnrukh.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۰۴)

چکیده

تنش دمای بالا به‌عنوان یک چالش محیطی، رشد و نمو گیاهان را محدود می‌کند. گیاهان مکانیسم‌های مختلفی را برای پاسخ به تنش گرما توسعه داده‌اند. در پژوهش حاضر جهت شناخت جنبه‌های مولکولی و بررسی عملکردی تحمل گرمایی، داده‌های ریزآرایه پروفایل بیانی تنش گرما گیاهچه‌های آرابیدوپسیس با شماره دسترسی GSE63128 از پایگاه داده‌ی GEO دریافت و مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از کنترل کیفیت و نرمال‌سازی داده‌ها، از بسته‌ی Limma برای ارزیابی ژن‌هایی با بیان افتراقی استفاده شد. تعداد ۷۷۸۰ ژن با بیان افتراقی در سطح معنی‌داری ۰/۰۱ و ۲ < |log2Fold change| شناسایی شدند که در مراحل بعدی به بررسی دسته‌بندی هستی‌شناسی، مسیرهای KEGG، شبکه برهم‌کنش پروتئین/پروتئین و ژن‌های کلیدی بالقوه آن‌ها با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی پرداخته شد. مشخص شد که در فرآیند بیولوژیکی، مهم‌ترین عبارت‌ها برای ژن‌هایی با بیان افتراقی پاسخ‌دهنده به تنش گرما مربوط به تنظیم رونویسی، فرایندهای اکسیداسیون/احیا و پاسخ به هورمون آبسزیک‌اسید می‌باشند. همچنین بر اساس بررسی مسیرهای متابولیکی در پایگاه داده‌ی KEGG، مسیرهای انتقال سیگنالی هورمون‌های گیاهی، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و متابولیسم گلیسروفسفولیپیدها تحت تاثیر تنش گرما قرار گرفتند. از بین ژن‌های کلیدی شناسایی شده با درجه ارتباط بالا در ماژول‌ها، ژن‌های *ARF5/MP*، *TIR1* به‌عنوان گیرنده اکسین، *WOL* به‌عنوان گیرنده مسیر سایتوکنین، *SDP1L* ژن مؤثر در تجزیه تری آسیل گلیسرول، *LPAAT2/4* ژن‌های مؤثر در بیوسنتز فسفولیپیدها و ژن‌های مؤثر در بیوسنتز پرولین (*P5CS1* و *P5CS2*) به‌عنوان ژن‌هایی که نقش کلیدی در پاسخ به تنش گرما دارند، معرفی شدند. بررسی عملکرد این ژن‌ها مشخص کرد که پاسخ‌های سازگاری به تنش گرما عمدتا به تنظیم رشد مریستم انتهای ساقه و ریشه، رشد هیپوکوتیل، توسعه بافت‌های آوندی، فعال‌سازی پروتئین‌های شوک گرمایی، تغییر ترکیب لیپیدهای غشاء و تنظیم اکسیداسیون/احیا سلولی مربوط می‌شود. از این‌رو برنامه‌های اصلاحی جهت تقویت تحمل به گرما بایستی از طریق دست‌کاری اجزای دخیل در این مسیرها صورت گیرد.

واژه‌های کلیدی

آرابیدوپسیس
تنش گرما
ریزآرایه
ژن‌های کلیدی
مسیرهای متابولیکی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]

مقدمه

تنش گرما به‌عنوان یک چالش محیطی، رشد و نمو گیاهان را تهدید می‌کند. جهت درک بهتر مکانیسم‌های سازگاری گیاهان با تنش گرمایی، مطالعات زیادی در راستای تعیین خصوصیت ژن‌هایی با بیان افتراقی[1] (DEGs) در پاسخ به تنش گرمایی در *Arabidopsis* انجام شده است (Gong et al. 2020). به محض وقوع تنش، یک سری مکانیسم‌های دفاعی تحت عنوان "پاسخ‌های تنش گرمایی[2]" فعال می‌شوند که گیاه را از آسیب ناشی ازتنش گرمایی محافظت می‌کنند. فاکتورهای رونویسی تنش گرمایی[3] متعلق به خانواده‌ای از فاکتورهای رونویسی هستند که توالی آن‌ها در تمام یوکاریوت‌ها حفاظت شده است. مشخص شده است فاکتور رونویسی تنش گرمایی HSFA1s تنظیم کننده اصلی تحمل به گرما می‌باشد. این فاکتور رونویسی بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش گرمایی را که به نوبه خود سنتز چاپرون‌ها، آنزیم‌های دخیل در تخریب پروتئین‌های واسرشت شده و حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را تنظیم می‌کنند، فعال می‌کند (Ohama et al. 2017; Yoshida et al. 2011). مشخص شده است که در شرایط نرمال، HSP70 و HSP90 با مهار HSFA1s از فعالیت آن جلوگیری می‌کنند. تحت شرایط تنش، HSFA1s از HSP70/90 آزاد شده و فعال می‌شود (Hahn et al. 2011). علاوه بر مسیرهای وابسته به HsfA1، برخی از ژن‌ها، مکانیسم‌های تحمل به گرما را مستقل از HsfA1s تنظیم می‌کنند که از آن جمله می‌توان به عملکرد پروتئین bZIP28 (Sun et al. 2013)، فعال کننده رونویسی DREB2A (Mizoi et al. 2019) و سایر فاکتورهای رونویسی HsfA از جمله HsfA5، HsfA4، و HsfA9 اشاره کرد (Baniwal et al. 2007; Kotak et al. 2007; von Koskull-Döring et al. 2007). از این رو سیستم دفاعی که در گیاهان پاسخ به تنش گرما را هدایت می‌کند، مکانیسم سازگاری پیچیده‌ای است که شبکه‌ای از تنظیم بیان ژن‌ها، فاکتورهای رونویسی و برنامه‌ریزی مجدد متابولیکی را در برمی‌گیرد. هرچند نقش ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی به‌خوبی در تنش گرما مشخص شده است اما این مطالعات بر اثرات انفرادی ژن‌ها و رونوشت‌ها به تنهایی بحث شده است و نمی‌توان توضیح جامعی در خصوص مکانیسم تنش گرما در سطح سلولی بیان داشت. لذا یافتن عملکردهای سیستماتیک الگوهای بیان ژنی نیازمند بررسی گروهی ژن‌ها و استفاده از داده‌های ریزآرایه برای ایجاد شبکه‌های ژنتیکی می‌باشد (Mantione et al. 2014). آنالیز شبکه ژنی به عنوان یک روش قدرتمند در آنالیز داده‌های بیان ژن است که منجر به شناسایی گروه‌های عملکردی مرتبط با تنش گرما از داده‌های بیانی می‌شود. هر گروه ژنی (مدول) متشکل از ژن‌هایی است که پروفایل بیانی آن‌ها در میان نمونه‌های مختلف به شدت با یکدیگر هم‌بستگی دارند (Shen et al. 2017). در این شبکه، ژن‌ها در صورتی با هم در ارتباط هستند که پروفایل بیانی آن‌ها با تغییر شرایط محیطی به صورت هم‌زمان تغییر کند که به وسیله‌ی هم‌بستگی بدست آمده میان جفت ژن‌ها از طریق خوشه‌بندی سلسله مراتبی تعیین می‌شود (Langfelder and Horvath 2008; Jafarzadegan et al. 2019). در مطالعه حاضر نیز از داده‌های ریزآرایه گیاهچه‌های آرابیدوپسیس تحت تنش گرما و شرایط کنترل برای آنالیز هم‌بیانی و شناسایی گروه‌های ژنی و ژن‌های کلیدی[4] پاسخ‌دهنده به تنش برای درک بهتر مکانیسم تنش گرما و توسعه واریته‌های مقاوم استفاده شد.

مواد و روش‌ها

از پایگاه داده‌ی ریزآرایه GEO[5] (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) داده‌های مربوط به آرابیدوپسیس با شماره دسترسی GSE63128 و اندازه‌گیری میزان بیان ژن با استفاده از پلت‌فرم Affymetrix Arabidopsis ATH1 Genome Array، دریافت و مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). کنترل کیفیت داده‌های خام دریافت شده از پایگاه با استفاده از بسته‌ی Limma (Ritchie et al. 2015) موجود در نرم‌افزار R بر اساس روش تحلیل مؤلفه‌های اساسی صورت پذیرفت.

[1] Differentially expressed genes
[2] Heat stress response (HSR)
[3] Heat stress transcription factors (Hsfs)
[4] Hub genes
[5] Gene Expression Omnibus

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]

جدول ۱- شماره دسترسی و معرفی نمونه‌های مورد استفاده در آنالیزهای پژوهش حاضر

اطلاعات نمونه	شماره دسترسی
Control08hr, 18 days old, biological rep1	GSM1541844
Control24hr, 19 days old, biological rep1	GSM1541846
Heat08hr, biological rep1	GSM1541849
Heat24hr, biological rep1	GSM1541850
Control08hr, 18 days old, biological rep2	GSM1541853
Control24hr, 19 days old, biological rep2	GSM1541855
Heat08hr, biological rep2	GSM1541858
Heat24hr, biological rep2	GSM1541859
Control08hr, 18 days old, biological rep3	GSM1541862
Control24hr, 19 days old, biological rep3	GSM1541864
Heat08hr, biological rep3	GSM1541867
Heat24hr, biological rep3	GSM1541868

در ادامه نرمال‌سازی داخل ریزآرایه‌ها و نرمال‌سازی بین نمونه‌ها به‌ترتیب با استفاده از روش‌های Loess و Quantile انجام شد. از بسته‌ی Limma برای تجزیه و تحلیل و نیز مصورسازی نتایج و داده‌های آنالیز تفاوت بیان استفاده شد. بسته‌ی Limma مبتنی بر R است و معیار شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی و معنی‌دار بودن Fold Change بیشتر از ۲ و کمتر از ۲- و p- Valu کمتر مساوی ۰/۰۱ بود.

در پایگاه داده‌ی DAVID (Huang et al. 2009) به آدرس بر خط https://david.ncifcrf.gov ارزیابی مسیرهای بیولوژیکی و نیز ویژگی‌های ساختاری و عملکردی ژن‌ها انجام شد. نتایج حاصل از ارزیابی‌های انجام شده بر اساس روش‌های آماری مختلف بررسی و بر اساس سطح معنی‌داری ۱٪ گزارش شد. بررسی ارتباط بین ژن‌های با بیان افتراقی در سطح پروتئین از نرم‌افزار STRING (Szklarczyk et al. 2019) به آدرس برخط https://string-db.org استفاده شد. در این نرم‌افزار هر تعامل با نمره‌ی ترکیبی ۰ تا ۱ معرفی شد. در ارزیابی‌های پژوهش حاضر تعاملات با نمرات ترکیبی بالاتر از ۰/٤ انتخاب شدند. در ادامه برای تشخیص پروتئین‌های با هم تداخل‌دار در شبکه‌های وزنی با استفاده از روش گسترش همسایگی از نرم‌افزار Cytoscap استفاده شد (Shannon et al. 2003)، بر این اساس شناسایی ژن‌های بزرگ اثر به کمک نرم‌افزار CytoNCA (Tang et al. 2015) و یافتن کلاسترهای مربوط به هر شبکه با نرم‌افزار CytoCluster (Li et al. 2017) صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

پس از نرمال‌سازی داده‌ها نمودار جعبه‌ای نحوه‌ی توزیع مقادیر نمونه‌های انتخابی (شکل ۱ الف) و نمودار PCA (شکل ا ب) در سطح معنی‌داری یک درصد ترسیم شد که نشان از توزیع مناسب نمونه‌ها و مناسب بودن کیفیت برای ادامه‌ی مراحل آنالیز بود. از روش PCA برای کاهش تعداد متغیرها نسبت به تعداد متغیرهای اساسی استفاده شد و با استفاده از این روش تنوع بین نمونه‌ها و کل واریانس مجموعه‌ی داده‌ها بررسی شد.

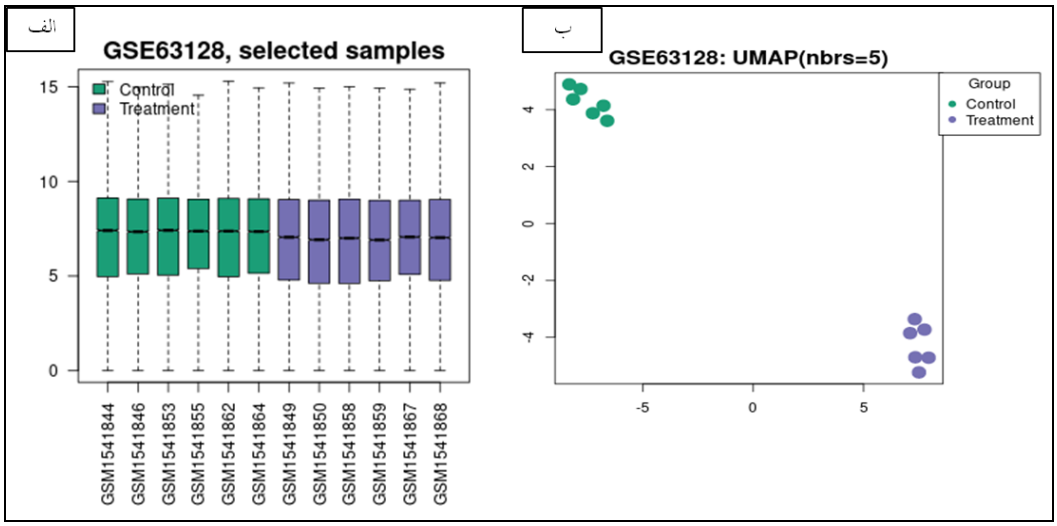
بر اساس آنالیزهای بیان افتراقی صورت گرفته تعداد ۷۷۸۰ ژن در سطح معنی‌داری ۰/۰۱ تفاوت معنی‌دار نشان داد که از این میان ۲۷٦۸ ژن افزایش و ۵۰۱۲ ژن کاهش بیان نشان دادند.

ارزیابی هستی‌شناسی ژن‌های معنی‌دار و دسته‌بندی "عبارت‌ها"[1] به سه دسته‌ی بیولوژیکی[2] (BP)، سلولی[3] (CC)، مولکولی[4](MF) با استفاده از پایگاه DAVID و در سطح معنی‌داری ۰/۰۱ صورت گرفت که نتایج آن در شکل ۲ خلاصه شده است. نتایج نشان داد که در بخش عملکرد مولکولی مهمترین عبارت‌ها مربوط به فعالیت اتصال به پروتئین، DNA و ATP و فعالیت فاکتورهای رونویسی می‌باشند. مهم‌ترین عبارت‌ها در فرایندهای بیولوژیکی به تنظیم رونویسی، فرایندهای اکسیداسیون و احیاء و پاسخ به آبسزیک اسید مربوط می‌شود. در بخش سلولی نیز بیشترین فعالیت به سیتوپلاسم، کلروپلاست، غشای پلاسمایی و پلاسمودسماتا اختصاص یافت.

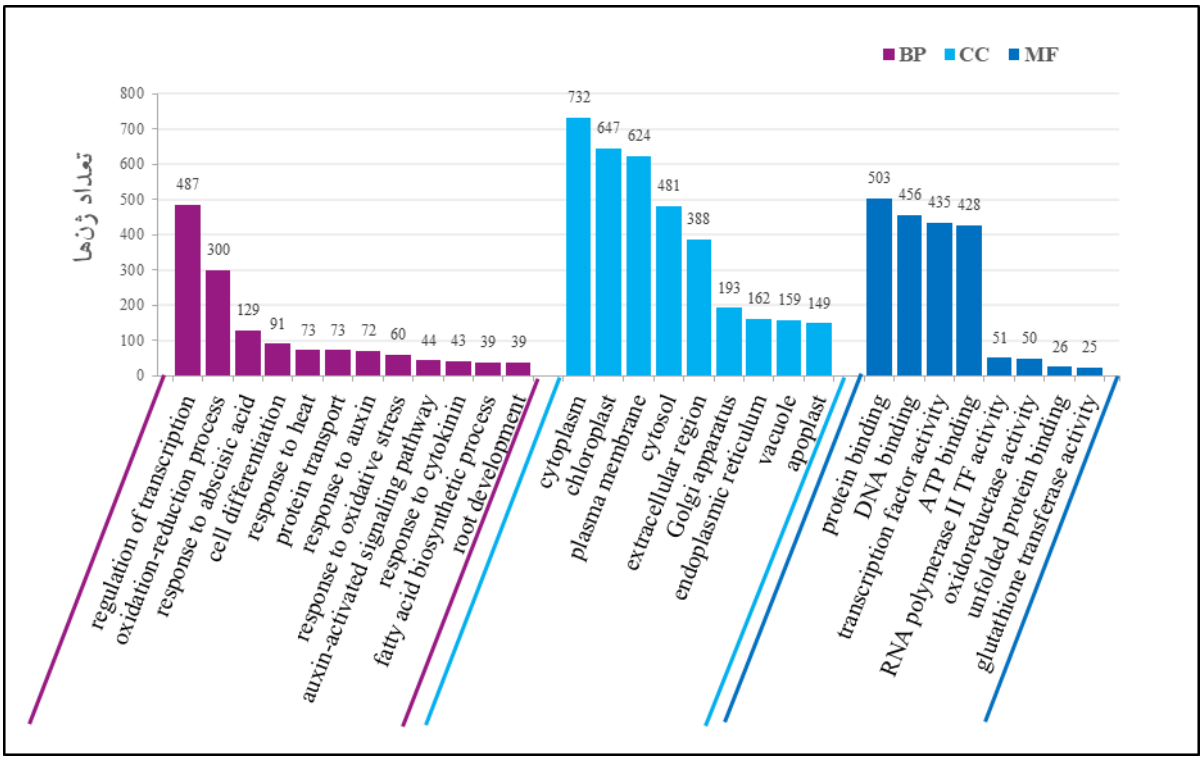
بر اساس بررسی مسیرهای متابولیکی در پایگاه داده‌ی KEGG تعداد ۳۱ مسیر معنی‌دار شد که انتقال هورمون گیاهی، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و مسیر گلیسروفسفولیپید و گلیسرولیپید برای انجام مراحل بعدی آنالیز انتخاب شدند (جدول ۲).

[1] Terms
[2] Biological Process
[3] Cellular Component
[4] Molecular Function

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]



شکل۱- الف. نمای شماتیک از نمودار جعبه‌ای نحوه‌ی توزیع مقادیر نمونه‌های مورد استفاده پس از نرمال‌سازی ب. نمای شماتیک از نمودار بررسی تنوع بر اساس آنالیز PCA



شکل ۲- دسته‌بندی هستی‌شناسی ژن‌هایی با بیان افتراقی پاسخ دهنده به تنش گرما در آرابیدوپسیس

جدول ۲- مسیرهای مورد مطالعه و اطلاعات حاصل از ارزیابی آن‌ها

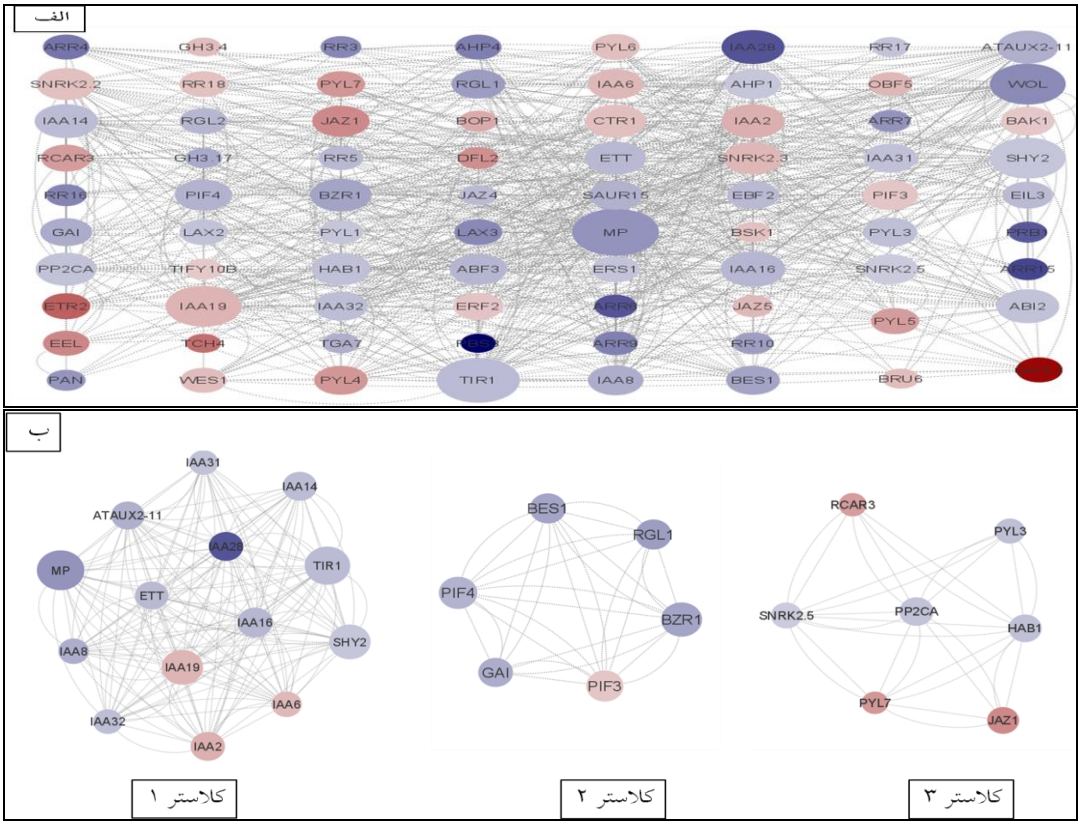
ردیف	مسیر	تعداد ژن‌های شناسایی شده	تعداد کلاسترهای ترسیم شده
۱	انتقال سیگنال هورمون گیاهی	۸۱	۳
۲	بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه	۳۰۵	۵
۳	مسیر گلیسروفسفولیپید و گلیسرولیپید	۳۶	۲

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]

بر اساس بررسی مسیرهای متابولیکی در پایگاه داده‌ی DAVID، ۸۱ ژن مرتبط با مسیر انتقال سیگنال هورمون گیاهی شناسایی شد که شبکه‌ی ژن‌های درگیر آن در شکل ۳ (الف) قابل مشاهده است. میزان بیان هر ژن بر اساس شدت رنگ در شکل مشخص شده است. ژن‌هایی که دارای بالاترین میزان بیان هستند، شدت رنگ بیشتری را نشان می‌دهند. اطلاعات مربوط به "ژن‌های کلیدی" با بالاترین درجه مرتبط با مسیر انتقال هورمون گیاهی (جدول ۳) نشان داد که ژن‌های *MP*، *TIR1* و *WOL* در پاسخ به تنش گرمایی بالاترین مقادیر درجه ارتباط با گره‌های دیگر را دارا می‌باشند.

پروتئین کد شده توسط ژن Monoptros (*MP*)، یک فاکتور رونویسی ARF5[1] در بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به اکسین می‌باشد که به‌عنوان تنظیم‌کننده کلیدی در تشکیل بافت‌های آوندی در آرابیدوپسیس شناخته شده است (Ulmasov et al. 1999). در غیاب اکسین، MP به‌وسیله پروتئین‌های بازدارنده Aux/IAA مهار می‌شود. اما در حضور اکسین، پروتئین بازدانده بواسطه فعالیت پروتئازومی $SCF^{TIR1/AFB}$ تجزیه می‌شود، لذا اثر مهارکنندگی آن روی فاکتور رونویسی MP برداشته شده و سبب بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به اکسین می‌شود (Hardtke and Berleth 1998). در مطالعه‌ی Zhu et al. (2022) نیز افزایش بیان فاکتورهای رونویسی MP/ARF5 و ژن‌های هدف آن تحت تنش گرما و خشکی در گیاه حد واسط *Moricandia suffruticosa* C3-C4 مشاهده شد. *TIR1* به‌عنوان کمک‌گیرنده اکسین در تحریک فعالیت‌های این فیتوهورمون در پاسخ به تنش گرما شناخته شده است (Shu et al. 2015; Yu et al. 2022). این کمک‌گیرنده جزئی از ماشین پروتئازی $SCF^{TIR1/AFB}$ می‌باشد که در غلظت‌های بالای اکسین، مقدمات یوبی‌کوئیتینه شدن و هضم پروتئولیتیکی بازدارنده رونویسی Aux/IAA و آزادسازی فاکتورهای رونویسی ARF تحت تنش گرما را فراهم می‌کند و با کنترل اختصاصی رونویسی ژن‌های پائین دست سبب تحریک فعالیت مسیر اکسین می‌شود (Wang et al. 2016).

[1] Auxin response factor 5/MONOPTROS



شکل ۳- الف. شبکه‌ی مرتبط با ژن‌های مسیر انتقال هورمون گیاهی و ب. کلاسترهای حاصل از این شبکه

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]

جدول ۳- ژن‌های کلیدی با بالاترین مقادیر درجه مرتبط با انتقال هورمون گیاهی

ژن	درجه ارتباط با گره‌های دیگر	مرکزیت میانی	مرکزیت درونی
MP	۵۸	۹۱۹/۶۰۶۲	۰/۵۴۲۲
TIR1	۵۴	۶۰۰/۲۹۷۸	۰/۵۷۰۳
WOL	۴۶	۹۰۲/۷۶۴۵	۰/۵۴۶۰
SHY2	۴۶	۳۱۷/۸۱۶۷	۰/۵۲۷۳
IAA19	۴۶	۲۲۱/۵۰۷۲	۰/۴۹۰۴
IAA16	۳۴	۹۲/۷۷۷۴	۰/۴۷۵۳

جدول ٤- ژن‌های کلیدی با بالاترین مقادیر درجه مرتبط با مسیر گلیسروفسفولیپید و گلیسرولیپید

	ژن	درجه ارتباط با گره‌های دیگر	مرکزیت میانی	مرکزیت درونی
۱	SDP1-LIKE	٥٤	٧٦/٠٨٨٧	٠/٣١٢٥
۲	LPAT4	٤٦	٤٠/٢٥٣٠	٠/٣٠١٧
۳	LPAT2	٤٤	٣٧/٠٥٥٥	٠/٢٩٩١
٤	PLDALPHA1	٤٢	٥٣/٩٣٧٧	٠/٢٩٦٦

Wooden leg (*Wol*) یکی دیگر از "ژن‌های کلیدی" با بالاترین مقادیر درجه ارتباط با مسیر سیگنالی هورمون‌های گیاهی در پاسخ به تنش گرما می‌باشد. مشخص شده است که این ژن یک گیرنده دو جزئی هیستیدین کینازی (AHK4[1]) را کد می‌کند که سیگنال سایتوکنین را از عرض غشاء پلاسمائی منتقل می‌کند و در تنظیم تکثیر سلولی بافت‌های آوندی و تمایز آن‌ها نقش دارد (Mahonen et al. 2000; Kuroha et al. 2006). مطالعات دیگر نشان داد شوک گرمایی سبب افزایش سریع و موقت میزان تجمع سایتوکنین و رشد هیپوکوتیل می‌شود. بدین ترتیب که رشد هیپوکوتیل در یک رفتار وابسته به دما به‌وسیله گیرنده‌های هیستیدین کینازی کنترل می‌شود، به‌گونه‌ای که جهش در ژن کننده گیرنده‌های سایتوکنین (*AHK*) و اختلال در مسیر سیگنالی CK، رشد هیپوکوتیل را در دمای بالا به‌شدت مهار می‌کند (Cerný et al. 2014). شوک گرمایی با تقویت تولید دای متیل آلیل دای فسفات (DMDP) که پیش‌ساز سایتوکنین می‌باشد از یک سو میزان تجمع این هورمون گیاهی را به‌طور موقت تقویت می‌کند و از سوی دیگر اضافی DMDP صرف بیوسنتز ایزوپرن‌ها می‌شود. با افزایش دما و تصاعد ایزوپرن‌ها، گیرنده‌های هیستیدین کینازی موجود در عرض غشای سیتوپلاسمی، سیگنال افزایش دما را دریافت می‌کنند که نهایتاً سبب القاء پاسخ‌های سیگنالینگ سایتوکنین و تحریک رشد هیپوکوتیل می‌شوند (Dobrá et al. 2015; Skalák et al. 2016).

کلاستربندی ژن‌های مرتبط با شبکه‌ی ژنی مسیر انتقال هومون‌های گیاهی با استفاده از نرم‌افزار CytoCluster (در سطح معنی‌داری ۰/۰۵) منجر به شناسایی سه کلاستر شد که در کلاستر اول مسیر پاسخ به محرک اکسین بالاترین فراوانی را نشان داد که با توجه به نقش اکسین در تنظیم رشد مریستم ریشه، افزایش تعداد ریشه‌های جانبی و تقویت ریشه‌دهی (Promchuea et al. 2017) می‌توان به ضرورت عملکرد آن در پاسخ به تنش گرما پی برد. در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده بود که بهبود تحمل به گرما ارتباط مستقیمی با بهبود خصوصیات ریشه و تقویت سیستم ریشه‌دهی گیاه دارد (Werner et al. 2010; Mackova et al. 2013). در کلاستر دوم ژن‌های مربوط به مسیر سیگنالی و در کلاستر سوم ژن‌های مرتبط با مسیر پاسخ به تنش بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند (شکل ۳ ب).

بر اساس بررسی مسیرهای متابولیکی در پایگاه داده‌ی DAVID، ٣٦ ژن مرتبط با مسیر گلیسروفسفولیپید و گلیسرولیپید شناسایی شدند (شکل ٤-الف) که از این میان ژن مؤثر در تجزیه تری آسیل گلیسرول (*SDP1L*) و ژن‌های مؤثر در بیوسنتز فسفولیپیدها (*LPAAT2/4*) به‌عنوان "ژن‌های کلیدی" با بالاترین مقادیر درجه ارتباط با پاسخ به تنش گرما معرفی شدند (جدول ٤). نتیجه‌ی

[1] *Arabidopsis* Histidin Kinase 4

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]

کلاستربندی ژن‌های مرتبط با این شبکه‌ی ژنی منجر به شناسایی دو کلاستر شد که در شکل ٤-ب نشان داده شده‌است. در کلاستر اول مسیرهای مرتبط با فرایند متابولیسم فسفو لیپید[1] بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند و در کلاستر دوم مسیرهای مربوط به فرایندهای متابولیکی لیپیدهای سلولی[2]، متابولیک و بیوسنتز لیپیدها[3] در صدر گروه‌بندی قرار گرفتند.

در مطالعه Higashi et al. (2015) مشخص شد که علاوه بر تقویت بیان ژن‌های مؤثر در بیوسنتز تری آسیل گلیسرول (TGA)، بیان ژن‌های *SDP* و *SDP1L* نیز که در هیدرولیز تری آسیل گلیسرول‌ها نقش دارند، در دمای بالا افزایش یافت. افزایش گونه‌های ٥٤:٩ تری‌آسیل‌گلیسرول‌های متشکل از اسیدهای چرب اسید لینولنیک ١٨:٣ همراه با افزایش بیان و فعالیت لیپازهای تجزیه کننده TGA، می‌تواند بیانگر تغییر ترکیب گلیسرولیپیدهای غشاء پلاسمایی و کاهش تعداد گلیسرولیپیدهای حاوی گروه‌های آسیل غیراشباع موجود در غشا برای بروز پاسخ‌های سازگاری به تنش گرما باشد. به‌عبارت دیگر لیپازهایی که تحت تنش گرما القاء می‌شوند در کاتابولیسم گلیسرولیپیدهای غشاء نقش دارند و با جداسازی اسیدهای چرب ١٨:٣ شرایط را برای افزایش تجمع TAGهای ٥٤:٩ و انباشت آن‌ها در پلاستوگلوبول‌ها و تغییر ترکیب گلیسرولیپیدهای غشا فراهم می‌آورند. از سوی دیگر مطالعات لیپیدومیک نیز همبستگی بین تجزیه مونوگالاکتوزیل دی آسیل گلیسرول‌های[4] (MGDG) و بیوسنتز TAG در شبکه آندوپلاسمی را تایید کرد (Higashi et al. 2018). در حقیقت پاسخ اصلی گیاه به تنش گرما در آرابیدوپسیس در مسیر متابولیسم گلیسرولیپیدها به هموستازی لیپیدهای درون سلولی برای حفظ ساختار و عملکرد طبیعی غشاء وابسته است.

بر اساس بررسی مسیرهای متابولیکی در پایگاه داده‌ی DAVID، ٣٠٥ ژن مرتبط با مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه شناسایی شد (شکل ٥ الف) که ژن‌های پیرولین-٥-کربوکسیلات سینتتاز[5] (P5CS) و پیرولین-٥-کربوکسیلات ردوکتاز[6] (*P5CR*) که در مسیر بیوسنتزی پرولین مشارکت دارند، از "ژن‌های کلیدی" با بالاترین مقادیر درجه ارتباط با مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در پاسخ به تنش گرما معرفی شدند (جدول ٥)

مسیر اصلی سنتز پرولین در سیتوزول از طریق احیاء گلوتامات بوسیله عملکرد دو آنزیم P5CS و P5CR کاتالیز می‌شود. تجمع پرولین به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی گیاه در برابر شرایط نامناسب، رشد و گلدهی گیاه را تقویت می‌کند، لذا همبستگی مثبتی بین تجمع پرولین با تحمل تنش گرمایی در برخی محصولات وجود دارد.

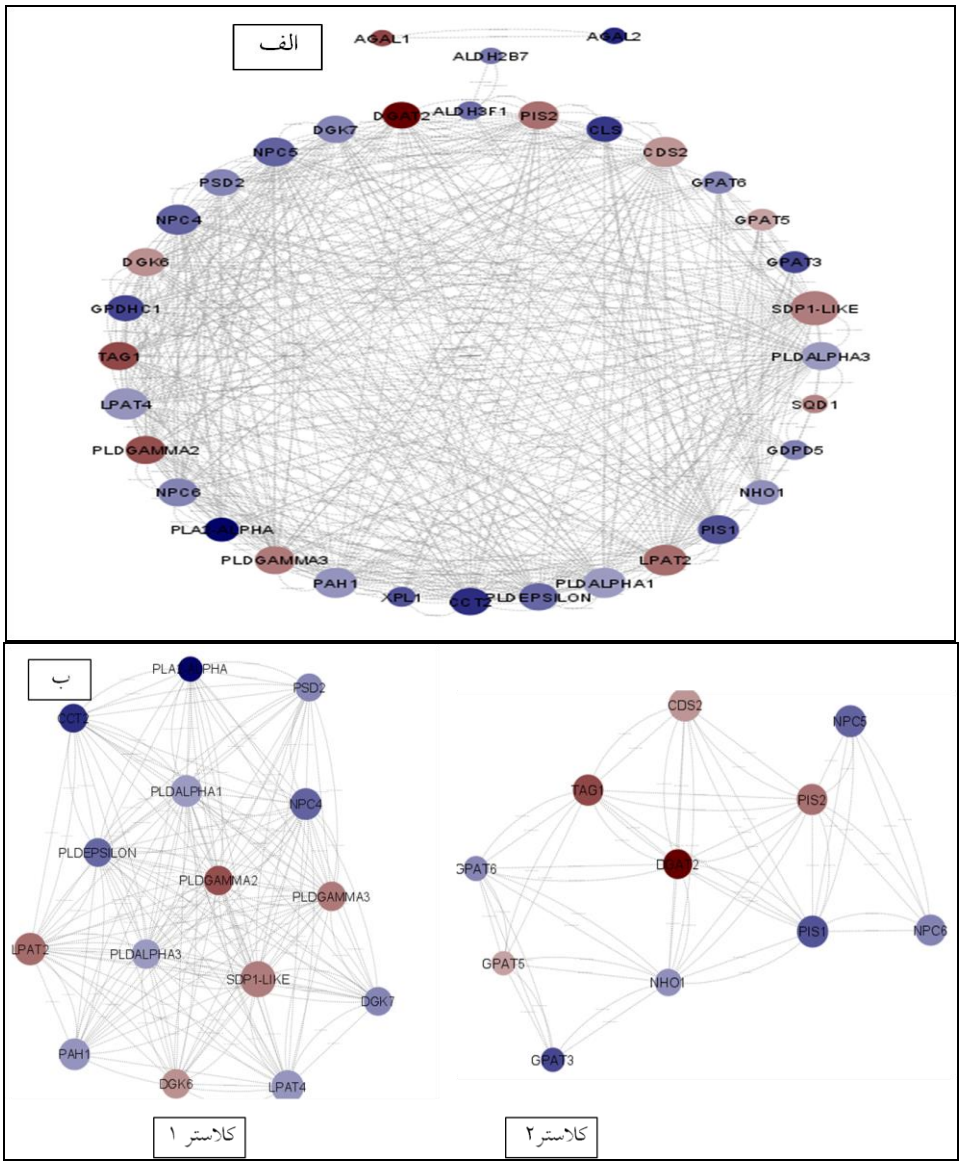
اخیراً شواهدی دال بر نقش این مولکول مهم در تعدیل تنش گرما با خنثی کردن رادیکال‌های H_2O_2 و O_2^- مشاهده شده است (Kavi Kishor et al. 2022). در مطالعات قبلی نشان داده شد که پرولین علاوه بر دیگر اثراتی که در نمو گیاه دارد (Trovato et al. 2019)، در تنظیم اندازه مریستم ریشه و رشد ریشه آرابیدوپسیس نیز مؤثر است (Biancucci et al. 2015).

در مطالعات اخیر نقش پرولین در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی جهت هموستازی ترکیبات ROS و تنظیم رشد مریستم ریشه تایید شد (Bauduin et al. 2022). علاوه بر نقش غیرمستقیم در فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پرولین به‌عنوان یک حذف‌کننده غیرآنزیمی قوی رادیکال‌های آزاد می‌باشد (Mohanty and Matysik 2001). بدین‌ترتیب که در طول سنتز پرولین با اکسیداسیون NADPH و تولید $NADP^+$، فعالیت آنزیم گلوکز-٦-فسفات دهیدروژناز که آنزیم کلیدی در مسیر پنتوزفسفات (PPP) می‌باشد، تحریک می‌شود.

از آنجا که مسیر پنتوزفسفات منبع اصلی تولیدکننده NADPH است قادر است مسیر آسکوربات/گلوتاتیون را که یکی از مؤثرین سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی است را فعال کند. از سوی دیگر مسیر پنتوزفسفات القاء شده توسط پرولین، قادر است مسیر شیکیمات و فنیل پروپانوئید را که منجر به تولید مولکول‌های پلی‌فنل آنتی‌اکسیدان می‌شود، تحریک کند و این فرایند قدرت حذف ترکیبات ROS در طول تنش را بهبود می‌بخشد (Forlani et al. 2017).

[1] Phospholipid metabolic process
[2] Cellular lipid metabolic process
[3] Lipid metabolic process and lipid biosynthetic process
[4] Monogalactosyl diacyl glycerol
[5] Pyrroline-5-carboxylate synthetase
[6] pyrroline-5-carboxylate reductase

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]



شکل ٤- الف. شبکه‌ی مرتبط با ژن‌های مسیر گلیسروفسفولیپید و گلیسرولیپید و ب. کلاسترهای حاصل از این شبکه

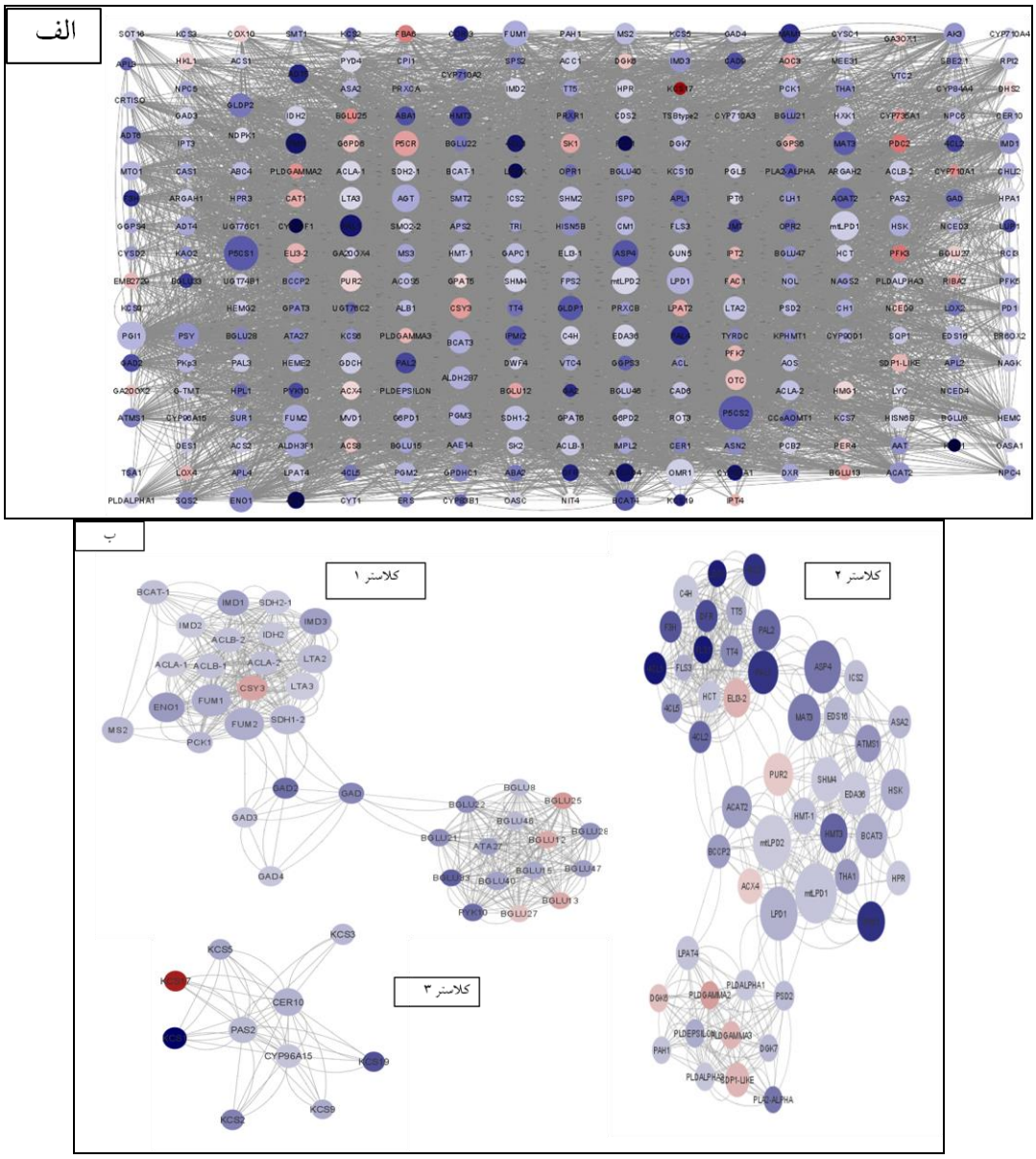
جدول ٥- ژن‌های کلیدی با بالاترین مقادیر درجه مرتبط با بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه

	ژن	درجه ارتباط با گره‌های دیگر	مرکزیت میانی	مرکزیت درونی
۱	P5CS1	۱۸۰	۳۱۹۹/۵۵۵۷	۰/۵۱۸۱
۲	P5CS2	۱۷٦	۲۳۰۹/۳٦٦	۰/۵۱۱۹
۳	mtLPD1	۱٤۰	۱۹۰۷/۵۱۸٦	۰/۵۰۱٦
۴	PGI1	۱۳٦	۳۲۱۲/۹۲۷۵	۰/٤۸۵٤
۵	AGT	۱۲۸	۱۸۹۱/۸۰۵٤	۰/٤۹۳٤
۶	OMR1	۱۲۸	۲۳۱۳/۳۵۳۳	۰/٤۸۷۰

در مجموع این یافته‌ها نشان داد که در مسیر متابولیت‌های ثانویه، پاسخ اصلی گیاه به تنش گرما، تقویت سنتز پرولین به‌واسطه نقش محوری آن در تنظیم پتانسیل /احیاء سلولی و تنظیم رشد گیاه می‌باشد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]

بر اساس کلاستربندی ژن‌های مرتبط با این شبکه‌ی ژنی سه کلاستر شناسایی شد که در شکل ۵.ب قابل مشاهده هستند. در کلاستر اول بیشترین فراوانی مربوط به مسیر فرایندهای متابولیکی کربوهیدرات‌ها می‌باشد. بر اساس یافته‌های قبلی مشخص شده است که کربوهیدارت‌ها، ضمن حفظ نقش ساختاری خود در بقاء گیاه، به‌واسطه خصوصیاتی که در مسیرهای سیگنالینگ تنش‌های گرمایی دارند، در بروز پاسخ‌های سازگاری سهیم هستند (Wind et al. 2010; Yu and Zheng 2012). در کلاستر دوم متابولیک مولکول‌های کوچک و اسیدآمینه‌های سلولی، در کلاستر سوم متابولیسم اسیدهای چرب با زنجیره‌ی بلند، بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. مطالعات قبلی نشان داده است که تنش گرما با افزایش سیالیت غشاء و از سوی دیگر تولید گونه‌های فعال اکسیژن، پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در ساختار غشاهای پلاسمایی را افزایش می‌دهد (Boca et al. 2014)، لذا تغییر ترکیب گلیسرولیپیدهای غشاء پلاسمایی و کاهش غیر اشباع‌سازی آن‌ها جهت پایداری غشاهای پلاسمایی، به‌عنوان یکی از پاسخ‌های سازگاری گیاه به گرما مطرح شده است (Higashi et al. 2015). در مطالعه‌ی Yu et al. (2022) نیز به نقش مسیرهای متابولیکی اسیدهای آمینه، متابولیسم لیپیدها و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در پاسخ به تنش خشکی اشاره شده است.



شکل ۵-الف. شبکه‌ی مرتبط با ژن‌های در ارتباط با مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و ب. کلاسترهای این شبکه

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]

نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر ارزیابی هستی‌شناسی ژن‌هایی با بیان افتراقی نشان داد که تنش گرما با عبارت‌های مرتبط با تنش اکسیداتیو، تنش آبسزیک اسید، مسیرهای سیگنالی فعال شده به‌وسیله اکسین و سایتوکنین، فرایندهای بیوسنتز اسیدهای چرب، نمو ریشه و تمایز سلولی مرتبط می‌باشد. همچنین بر اساس بررسی مسیرهای متابولیکی در پایگاه داده‌ی KEGG، مسیرهای انتقال سیگنالی هورمون‌های گیاهی، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و متابولیسم گلیسروفسفولیپیدها تحت تاثیر تنش گرما قرار گرفتند. با توجه به تشریح عملکرد "ژن‌های کلیدی" مربوط به مسیر انتقال سیگنالی هورمون‌های گیاهی، می‌توان نتیجه گرفت که برهم‌کنش اجزای دخیل در مسیر سیگنالینگ هورمون اکسین (TIR1 و ARF5/MP) و گیرنده هسیتیدین کینازی مربوط به مسیر سایتوکنین (Wol) سبب فعال‌سازی مسیرهای پائین دست و بروز پاسخ‌های تحمل به تنش گرما می‌شود که از آن جمله می‌توان به تنظیم دقیق رشد مریستم انتهای ساقه و ریشه، رشد هیپوکوتیل، توسعه بافت‌های آوندی و فعال‌سازی پروتئین‌های شوک گرمایی اشاره کرد. همچنین بررسی ژن‌های کلیدی دخیل در متابولیسم فسفوگلیسریدها نشان داد که علاوه بر ژن‌های دخیل در بیوسنتز فسفولیپیدها، ژن‌های مؤثر در تجزیه TAG (نظیر *SDP1L*) نیز در پاسخ به تنش گرما تاثیرگذار هستند. در حقیقت پاسخ اصلی گیاه به تنش گرما در آرابیدوپسیس در مسیر متابولیسم گلیسرولیپیدها به هموستازی لیپیدهای درون سلولی برای حفظ ساختار و عملکرد طبیعی غشاء وابسته است. از سوی دیگر شناسایی ژن‌های کلیدی مؤثر در بیوسنتز پرولین (*P5CS1* و *P5CS2*) نشان داد که در مسیر متابولیت‌های ثانویه، پاسخ اصلی گیاه به تنش گرما، تقویت سنتز پرولین بواسطه نقش محوری آن در تعدیل و خنثی‌سازی ترکیبات اکسیداتیو در گیاه می‌باشد. در مجموع، با توجه به شناسایی مؤلفه‌های کلیدی ذکر شده در پاسخ به تنش گرما می‌توان برنامه‌های اصلاحی جهت تقویت تحمل به گرما را از طریق دستکاری اجزای دخیل در این مسیرها انجام داد.

منابع

Baniwal SK, Chan KY, Scharf KD, Nover L (2007) Role of heat stress transcription factor HsfA5 as specific repressor of HsfA4. Journal of Biological Chemistry 282:3605-3613.

Bauduin S, Latini M, Belleggia I, Migliore M, Biancucci M, Mattioli R, Francioso A, Mosca L, Funck D , Trovato M (2022) Interplay between proline metabolism and ROS in the fine tuning of root-meristem size in *Arabidopsis.* Plants 11:1512.

Biancucci M, Mattioli R, Moubayidin L, Sabatini S, Costantino P, Trovato M (2015) Proline affects the size of the root meristematic zone in *Arabidopsis*. BMC Plant Biology 15:1-14.

Boca S, Koestler F, Ksas B, Chevalier A, Leymarie J, Fekete A, Mueller MJ, Havaux M (2014) *Arabidopsis* lipocalins AtCHL and AtTIL have distinct but overlapping functions essential for lipid protection and seed longevity. Plant, Cell & Environment 37:368-381.

Cerný M, Jedelský PL, Novák J, Schlosser A, Brzobohatý B (2014) Cytokinin modulates proteomic, transcriptomic and growth responses to temperature shocks in *Arabidopsis*. Plant, Cell and Environment 37:1641-1655.

Dobrá J, Cerný M, Štorchová H, Dobrev P, Skalák J, Jedelský PL, Lukšanová H, Gaudinová A, Pešek B, Malbecka J, et al. (2015) The impact of heat stress targeting on the hormonal and transcriptomic response in *Arabidopsis*. Plant Science 231:52-61

Forlani G, Nocek B, Chakravarthy S, Joachimiak A (2017) Functional characterization of four putative δ1-pyrroline-5-carboxylate reductases from *Bacillus subtilis.* Frontiers in Microbiology 8:1442.

Gong Z, Xiong L, Shi H, Yang S, Herrera-Estrella LR, Xu G, Chao DY, Li J, Wang PY, Qin F, Li J (2020) Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency. Science China Life Sciences 63:635-674.

Hahn A, Bublak D, Schleiff E, Scharf KD (2011) Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 chaperones and heat stress transcription factors in tomato. Plant Cell 23(2): 741-755.

Hardtke CS, Berleth T (1998) The *Arabidopsis* gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. EMBO Journal 17:1405-1411.

Higashi Y, Okazaki Y, Myoug, F, Shinozaki K, SaitoK (2015) Landscape of the lipidome and transcriptome under heat stress in *Arabidopsis thaliana*. Scientific Reports 5:10533.

Higashi Y, Okazaki Y, Takano K, Myouga F, Shinozaki K, Knoch E, Fukushima A, Saito K (2018) HEAT INDUCIBLE LIPASE1 remodels chloroplastic monogalac-tosyldiacylglycerol by liberating α-linoleni

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]

acid in *Arabidopsis* leaves under heat stress. Plant Cell 30:1887-1905.
Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nature protocols 4:44-57.
Jafarzadegan M, Safi-Esfahani F, Beheshti Z (2019) Combining hierarchical clustering approaches using the PCA method. Expert Systems with Applications 137:1-10.
Kavi Kishor PB, Suravajhala P, Rathnagiri P, Sreenivasulu N (2022) Intriguing role of proline in redox potential conferring high temperature stress tolerance. Frontiers in Plant Science 13:867531.
Kotak S, Vierling E, Bäumlein H, von Koskull-Döring P (2007) A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of *Arabidopsis*. Plant Cell 19:182-195.
Kuroha T, Ueguchi C, Sakakibara H, Satoh S (2006) Cytokinin receptors are required for normal development of auxin-transporting vascular tissues in the hypocotyl but not in adventitious roots. Plant and Cell Physiology 47:234-243.
Langfelder P, Horvath S (2008) WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. BMC Bioinformatics 9:1-13.
Li M, Li D, Tang Y, Wu F, Wang J (2017) CytoCluster: a cytoscape plugin for cluster analysis and visualization of biological networks. International journal of molecular sciences 18:1880.
Macková H, Hronková M, Dobrá J, Turečková V, Novák O, Lubovská Z, Motyka V, Haisel D, Hájek T, Prášil IT, Gaudinová A (2013) Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. Journal of Experimental Botany 64:2805-2815.
Mahonen AA, Bonke M, Kauppinen L, Riikone M, Benfey PN, Helariutta Y (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. Genes & Development 14:2938-2943.
Mantione KJ, Kream RM, Kuzelova H, Ptacek R, Raboch J, Samuel JM, Stefano GB (2014) Comparing bioinformatic gene expression profling methods: microarray and RNA-Seq. Medical Science Monitor Basic Research 20:138-141.
Mizoi J, Kanazawa N, Kidokoro S, Takahashi F, Qin F, Morimoto K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2019) Heat-induced inhibition of phosphorylation of the stress-protective transcription factor DREB2A promotes thermotolerance of *Arabidopsis thaliana*. Journal of Biological Chemistry 294:902-917.
Mohanty P, Matysik J (2001) Effect of proline on the production of singlet oxygen. Amino Acids 21:195-200.
Ohama N, Sato H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2017) Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. Trends in Plant Science 22:53-65.
Promchuea S, Zhu Y, Chen Z, Zhang J, Gong Z (2017) ARF2coordinates with PLETHORAs and PINs to orchestrate ABA-mediated root meristem activity in *Arabidopsis*. Journal of Integrative Plant Biology 59:30-43.
Ritchie ME, Phipson B, Wu DI, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK (2015) limma powers diferential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. Nucleic Acids Research 43:e47
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 research 13:2498-2504.
Shen PC, Hour AL, Liu LYD (2017) Microarray meta-analysis to explore abiotic stress-specific gene expression patterns in *Arabidopsis*. Botanical Studies 58:1-11.
Shu W, Liu Y, Guo Y, Zhou H, Zhang J, Zhao S, Lu M (2015) A Populus TIR1 gene family survey reveals differential expression patterns and responses to 1-naphthaleneacetic acid and stress treatments. Frontiers in plant science 6:719.
Skalák J, Černý M, Jedelský P, Dobrá J, Ge E, Novák J, Hronková M, Dobrev P, Vanková R., Brzobohatý B (2016) Stimulation of *ipt* overexpression as a tool to elucidate the role of cytokinins in high temperature responses of *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany 67:2861-2873.
Sun L, Lu SJ, Zhang SS, Zhou SF, Sun L, Liu JX (2013) The lumen-facing domain is important for the biological function and organelle-to-organelle movement of bZIP28 during ER stress in *Arabidopsis*. Molecular Plant 6:1605-1615.
Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P (2019) STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. Nucleic acids research 47:607-613.
Tang Y, Li M, Wang J, Pan Y, Wu FX (2015) CytoNCA: a cytoscape plugin for centrality analysis and evaluation of protein interaction networks. Biosystems 127:67-72.
Trovato MFG; Signorelli S; Funck D (2019) Proline metabolism and its functions in development and stress tolerance.; In: Hossain MA, Kumar V, Burritt D, Fujita M, Mäkelä P (Eds.) Osmoprotectant-mediated abiotic stress tolerance in plants, Springer Cham Press, Switzerland 41-72.
Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ (1999) Activation and repression of transcription by auxin-response factors. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 96:5844-5849.
von Koskull-Döring P, Scharf KD, Nover L (2007) The diversity of plant heat stress transcription factors. Trends in Plant Science 12:452-457.
Wang R, Zhang Y, Kieffer M, Yu H, Kepinski S, Estelle M (2016) HSP90 regulates temperature-dependent seedling growth in Arabidopsis by stabilizing the auxin co-receptor F-box protein TIR1. Nature communications 7:1-11.
Werner T, Nehnevajova E, Kollmer I, Novak O, Strnad M, Kramer U, Schmulling T (2010) Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and Tobacco. Plant Cell 22:3905-3920.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]

Wind J, Smeekens S, Hanson J (2010) Sucrose: metabolite and signaling molecule. Phytochemistry 71:1610-1614.
Yoshida T, Ohama N, Nakajima J, Kidokoro S, Mizoi J, Nakashima K, Maruyama K, Kim JM, Seki M, Todaka D, Osakabe Y (2011) *Arabidopsis* HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. Molecular Genetics and Genomics 286:321-332.
Yu B, Ming F, Liang Y, Wang Y, Gan Y, Qiu Z, Yan S, Cao B (2022) Heat stress resistance mechanisms of two cucumber varieties from different regions. International Journal of Molecular Sciences 23:1817.
Yu Q, Zheng X (2012) The crystal structure of human UDP-glucose pyrophosphorylase reveals a latch effect that influences enzymatic activity. Biochemical Journal 442:283-291.
Zhu X, Liu J, Sun X, Kuang C, Liu H, Zhang L, Zheng Q, Liu J, Li J, Wang H, Hua W (2022) Stress-induced higher vein density in C3-C4 intermediate *Moricandia suffruticosa* under drought and heat stress. Journal of Experimental Botany 73:6334-6351

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-02]