

مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی نیمرخ بیان ژن گیاهچه‌های آرابیدوپسیس به منظور شناسایی ژن‌های کلیدی پاسخ‌دهنده به تنفس گرم

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، ملاٹانی، 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 M¹, Taheri H^{*2}, Sadr AS³

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 به عنوان یک چالش محیطی، رشد و نمو گیاهان را محدود می‌کند. گیاهان مکانیسم‌های مختلفی را برای پاسخ به تنفس گرم را توسعه داده‌اند. در پژوهش حاضر جهت شناخت جنبه‌های مولکولی و بررسی عملکردی تحمل گرمایی، داده‌های ریزآرایه پروفایل بیانی تنفس گرم گیاهچه‌های آرابیدوپسیس با شماره دسترسی GSE63128 از پایگاه داده GEO دریافت و مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از کنترل کیفیت و فرمال‌سازی داده‌ها، از بسته‌ی Limma برای ارزیابی ژن‌هایی با بیان افتراقی استفاده شد. تعداد ۷۷۸۰ ژن با بیان افتراقی در سطح معنی‌داری ۰/۰۱ و $> 2 |\log_2 \text{Fold change}|$ 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 تنفس گرم مربوط به تنظیم رونویسی، فرایند‌های اکسیداسیون/احياء و پاسخ به هورمون آبزیک‌اسید می‌باشند. همچنین بر اساس بررسی مسیرهای متابولیکی در پایگاه داده KEGG، مسیرهای انتقال سیگنانالی هورمون‌های گیاهی، بیوسنتر متابولیت‌های ثانویه و متابولیسم گلیسروفسفولیپیدها تحت تاثیر تنفس گرم قرار گرفتند. از بین ژن‌های کلیدی شناسایی شده با درجه ارتباط بالا در مأذول‌ها، ژن‌های TIR1 ARF5/MP به عنوان گیرنده اکسین، WOL به عنوان گیرنده مسیر سایتوکین، SDPIL ژن مؤثر در تجزیه تری آسیل گلیسرول، LPAAT2/4 ژن‌های مؤثر در بیوسنتر فسفولیپیدها و ژن‌های مؤثر در بیوسنتر پرولین (P5CS1 و P5CS2) به عنوان ژن‌هایی که نقش کلیدی در پاسخ به تنفس گرم دارند، معرفی شدند. بررسی عملکرد این ژن‌ها مشخص کرد که پاسخ‌های سازگاری به تنفس گرم عمده‌تاً به تنظیم رشد مریستم انتهای ساقه و ریشه، رشد هیبوکوتیل، توسعه بافت‌های آوندی، فعل سازی پروتئین‌های شوک گرمایی، تغییر ترکیب لیپیدهای غشاء و تنظیم اکسیداسیون/احياء سلولی مربوط می‌شود. از این‌رو برنامه‌های اصلاحی جهت تقویت تحمل به گرمایی باستی از طریق دست‌کاری اجزای دخیل در این مسیرها صورت گیرد.

واژه‌های کلیدی

آرابیدوپسیس

تنفس گرم

ریزآرایه

ژن‌های کلیدی

مسیرهای متابولیکی

مقدمه

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 Langfelder and Horvath 2008; (Jafarzadegan et al. 2019) در مطالعه حاضر نیز از داده‌های ریزآرایه گیاهچه‌های آراییدوپسیس تحت تنش گرما و شرایط کنترل برای آنالیز همبیانی و شناسایی گروههای ژنی و ژن‌های کلیدی^۴ پاسخ‌دهنده به تنش برای درک بهتر مکانیسم تنش گرما و توسعه واریته‌های مقاوم استفاده شد.

مواد و روش‌ها

GEO^۵ از پایگاه داده‌ی ریزآرایه (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) (داده‌ی مربوط به آراییدوپسیس با شماره دسترسي GSE63128) و اندازه‌گیری میزان Affymetrix Arabidopsis ATH1 بیان ژن با استفاده از پلتفرم 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.

⁴ Hub genes⁵ Gene Expression Omnibus

تنش گرما به عنوان 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 افترافقی^۱ (DEGs) در پاسخ به تنش گرمایی در آنجم شده است (Gong et al. 2020). به محض وقوع تنش، یک سری مکانیسم‌های دفاعی تحت عنوان "پاسخ‌های تنش گرمایی"^۲ فعال می‌شوند که گیاه را از آسیب ناشی از تنش گرمایی محافظت می‌کنند. فاکتورهای رونویسی تنش گرمایی^۳ 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)، DREB2A (Mizoi et al. 2019) و سایر HsfA9، HsfA4، HsfA5 و HsfA از جمله HsfA از جمله Baniwal et al. 2007; Kotak et al. 2007; von (Koskull-Döring et al. 2007) اشاره کرد. 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 بر می‌گیرد. هرچند نقش ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی به خوبی در تنش گرما مشخص

¹ Differentially expressed genes² Heat stress response (HSR)³ Heat stress transcription factors (Hsfs)

یافتن کلاسترها مربوط به هر شبکه با نرم‌افزار CytoCluster (Li et al. 2017) صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

پس از نرمال‌سازی داده‌ها نمودار جعبه‌ای نحوی توزیع مقادیر نمونه‌های انتخابی (شکل ۱ الف) و نمودار PCA (شکل ۱ 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 ۲۷۶۸ ژن افزایش و ۵۰۱۲ ژن کاهش بیان نشان دادند.

ارزیابی هستی‌شناسی ژن‌های معنی‌دار و دسته‌بندی "عبارت‌ها"^۱ به سه دسته‌ی بیولوژیکی^۲ (BP)، سلولی^۳ (CC)، مولکولی^۴ (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، ATP و DNA 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، بیوستز متابولیت‌های ثانویه و مسیر گلیسروفسفولیپید و گلیسرولیپید برای انجام مراحل بعدی آنالیز انتخاب شدند (جدول ۲).

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 به ترتیب 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 مساوی ۰/۰۱ بود.

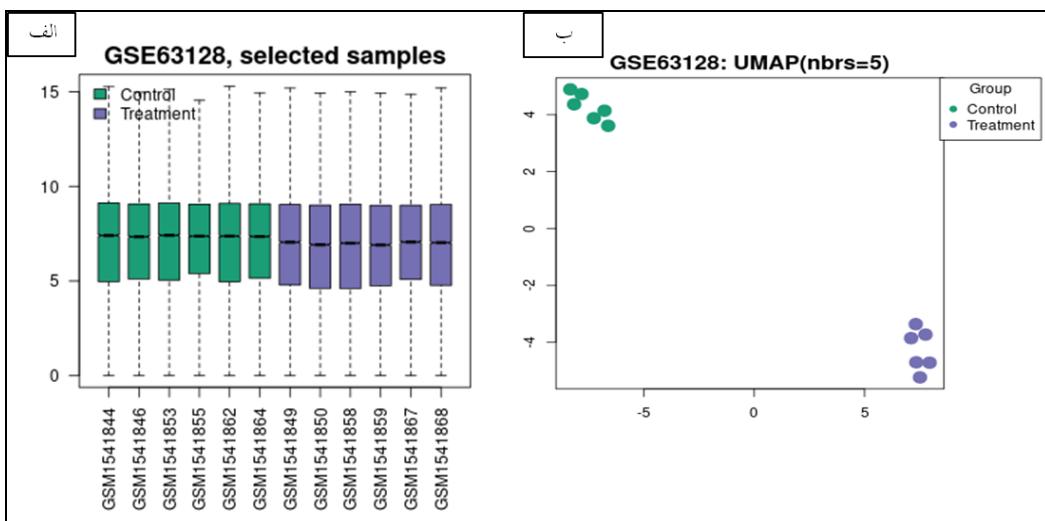
در پایگاه داده‌ی DAVID (Huang et al. 2009) به آدرس برخط https://david.ncifcrf.gov ارزیابی مسیرهای بیولوژیکی و نیز ویژگی‌های ساختاری و عملکردی ژن‌ها انجام شد. نتایج حاصل از ارزیابی‌های انجام شده بر اساس روش‌های آماری مختلف بررسی و بر اساس سطح معنی‌داری ۱٪ گزارش شد. بررسی ارتباط بین ژن‌های با بیان افتراقی 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 ۰/۴ انتخاب شدند. در ادامه برای تشخیص پروتئین‌های با هم تداخل دار 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

¹ Terms

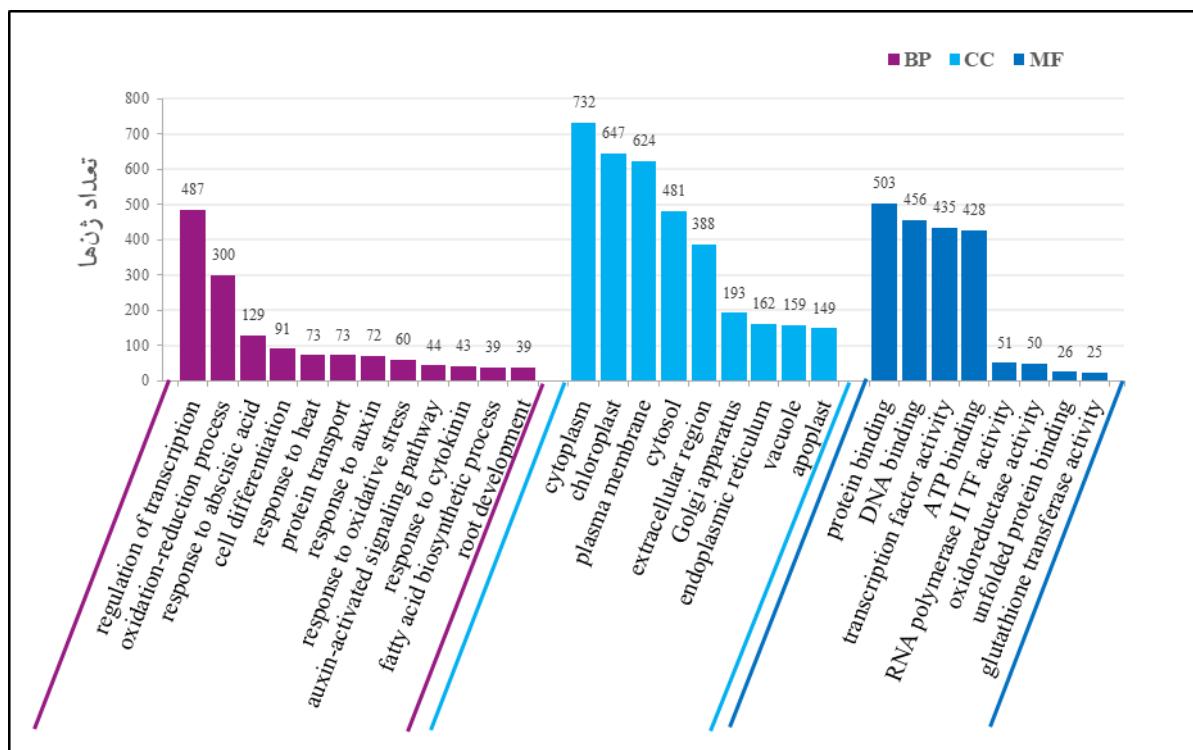
² Biological Process

³ Cellular Component

⁴ Molecular Function



شکل ۱- (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 گرمای در آراییدوپسیس

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

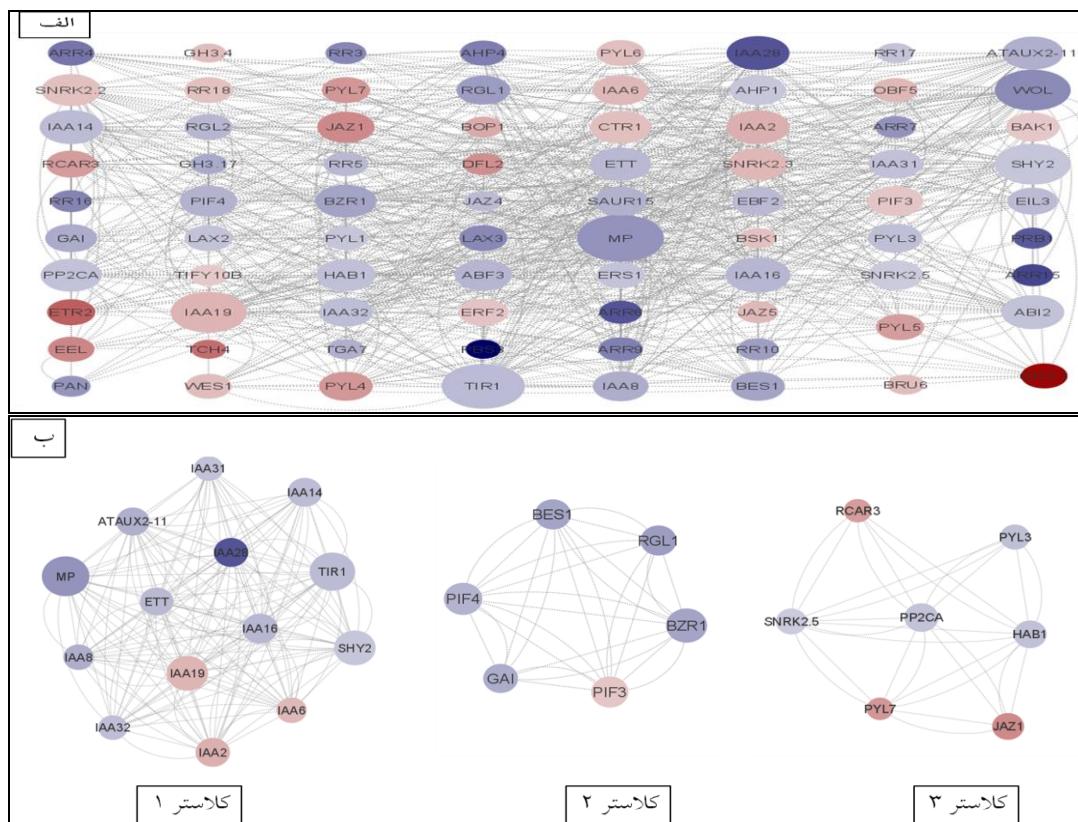
ردیف	مسیر	تعداد ژن‌های شناسایی شده	تعداد کلاسترهای ترسیم شده
۱	انتقال سیگنال هورمون گیاهی	۸۱	۳
۲	بیوسنتر متابولیت‌های ثانویه	۳۰۵	۵
۳	مسیر گلیسروفسفولیپید و گلیسرولیپید	۳۶	۲

می‌شود. اما در حضور اکسین، پروتئین بازدارنده بواسطه فعالیت پروتازومی $SCF^{TIR1/AFB}$ 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 تنش گرما مشاهده شد. *TIR1* به عنوان کمک‌گیرنده اکسین در تحریک فعالیت‌های این *Shu et al.* (2015; Yu et al. 2022) این کمک‌گیرنده جزئی از ماشین پروتازی $SCF^{TIR1/AFB}$ می‌باشد که در غلظت‌های بالای اکسین، مقدمات یوبیکوتینه شدن و هضم پروتولیتیکی بازدارنده ARF رونویسی Aux/IAA و آزادسازی فاکتورهای رونویسی تحت تنش گرما را فراهم می‌کند و با کنترل اختصاصی رونویسی ژن‌های پائین دست سبب تحریک فعالیت مسیر اکسین می‌شود (Wang et al. 2016).

بر اساس بررسی مسیرهای متابولیکی در پایگاه داده 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 *TIR1* MP و *WOL* در پاسخ به تنش گرمایی بالاترین مقادیر درجه ارتباط با گره‌های دیگر را دارا می‌باشند.

پروتئین کد شده توسط ژن *MP* Monoptros رونویسی $ARF5^1$ در بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به اکسین می‌باشد که به عنوان تنظیم‌کننده کلیدی در تشکیل بافت‌های آوندی در آراییدوپسیس شناخته شده است (*Ulmasov et al. 1999*). در غیاب اکسین، *MP* به وسیله پروتئین‌های بازدارنده Aux/IAA مهار

¹ Auxin response factor 5/MONOPTROS



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

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	۰/۴۲۲
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 ۴- ژن‌های کلیدی با بالاترین مقادیر درجه مرتبط با مسیر گلیسروفسفولیپید و گلیسرولیپید

ژن	درجه ارتباط با گره‌های دیگر	مرکزیت میانی	مرکزیت درونی
SDP1-LIKE ^۱	۵۴	۷۷۰/۸۸۷	۰/۳۱۲۵
LPAT4 ^۲	۴۶	۴۰/۲۵۳۰	۰/۳۰۱۷
LPAT2 ^۳	۴۴	۳۷/۰۵۵۵	۰/۲۹۹۱
PLDALPHA1 ^۴	۴۲	۵۳/۹۳۷۷	۰/۲۹۶۶

Saiytokenin و تحریک رشد هیپوکوتیل می‌شوند (Dobrá et al. 2015; Skalák et al. 2016).

کلاستریندی 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 محرك 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 سیگنانالی 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 ۳۶ ژن مرتبط با مسیر گلیسروفسفولیپید و گلیسرولیپید شناسایی شدند (شکل ۴-الف) که از این میان ژن مؤثر در تجزیه تری آسیل گلیسرول (SDP1L) و ژن‌های مؤثر در بیوسنتر فسفولیپیدها (LPAAT2/4) به عنوان "ژن‌های کلیدی" با بالاترین مقادیر درجه ارتباط با پاسخ به تنش گرما معرفی شدند (جدول ۴). نتیجه‌ی

Wooden leg (Wol) یکی دیگر از "ژن‌های کلیدی" با بالاترین مقادیر درجه ارتباط با مسیر سیگنانالی هورمون‌های گیاهی در پاسخ به تنش گرما می‌باشد. مشخص شده است که این ژن یک گیرنده دو جزئی هیستیدین کینازی (AHK4^۱) را کد می‌کند که سیگنانال سایتوکین 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 سایتوکین 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 کنترل گیرنده‌های سایتوکین (AHK) و اختلال در مسیر سیگنانالی 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 سایتوکین می‌باشد از یک سو میزان تجمع این هورمون گیاهی را به‌طور موقت تقویت می‌کند و از سوی دیگر اضافی DMDP صرف بیوسنتر ایزوپرن‌ها می‌شود. با افزایش دما و تصاعد ایزوپرن‌ها، گیرنده‌های هیستیدین کینازی با فعالیت دما افزایش غشاء سیتوپلاسمی، سیگنانال افزایش دما را موجود در عرض غشاء سیتوپلاسمی، سیگنانال افزایش دما را دریافت می‌کند که نهایتاً سبب القاء پاسخ‌های سیگنانالیگ

^۱ Arabidopsis Histidin Kinase 4

مسیر بیوستزی پرولین مشارکت دارند، از "ژن‌های کلیدی" با بالاترین مقادیر درجه ارتباط با مسیر بیوستز متابولیت‌های ثانویه در پاسخ به تنش گرما معرفی شدند (جدول ۵)

مسیر اصلی سنتز پرولین در سیتوزول از طریق احیاء گلوتامات بوسیله عملکرد دو آنزیم P5CR و P5CS کاتالیز می‌شود. تجمع پرولین به عنوان 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 تعديل تنش گرما با خشی 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 آنتی اکسیدانی، پرولین به عنوان یک حذف‌کننده غیرآنژیمی قوی رادیکال‌های آزاد می‌باشد (Mohanty and Matysik 2001). بدین ترتیب که در طول سنتز پرولین با اکسیداسیون NADPH و تولید $NADP^+$ ، فعالیت آنزیم گلوکر-۶-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 آسکوربیات/گلوتاتیون را که یکی از مؤثرین سیستم‌های آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدان می‌شود، تحریک کند و این فرایند قدرت حذف ترکیبات ROS در طول تنش را بهبود می‌بخشد (Forlani et al. 2017).

کلاستریندی ژن‌های مرتبط با این شبکه‌ی ژنی منجر به شناسایی دو کلاستر شد که در شکل ۴-ب نشان داده شده است. در کلاستر اول مسیرهای مرتبط با فرایند متابولیسم فسفو لیپید^۱ بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند و در کلاستر دوم مسیرهای مربوط به فرایندهای متابولیکی لیپیدهای سلولی^۲، متابولیک و بیوستز لیپیدها^۳ در صدر گروه‌بندی قرار گرفتند.

در مطالعه Higashi et al. (2015) مشخص شد که علاوه بر تقویت بیان ژن‌های مؤثر در بیوستز تری آسیل گلیسرول (TGA)، بیان ژن‌های SDPIL و SDP نیز که در هیدرولیز تری آسیل گلیسرول‌ها نقش دارند، در دمای بالا افزایش یافت. افزایش گونه‌های ۵۴:۹ تری آسیل گلیسرول‌های متخلک از اسیدهای چرب اسید لینولنیک ۱۸:۳ همراه با افزایش بیان و فعالیت لیپازهای تجزیه کننده TGA، می‌تواند بیانگر تغییر ترکیب گلیسرول‌لیپیدهای غشاء پلاسمایی و کاهش تعداد گلیسرول‌لیپیدهای حاوی گروه‌های آسیل غیراشبع موجود در غشا برای بروز پاسخ‌های سازگاری به تنش گرما باشد. به عبارت دیگر لیپازهایی که تحت تنش گرما القاء می‌شوند در کاتابولیسم گلیسرول‌لیپیدهای غشاء نقش دارند و با جداسازی اسیدهای چرب ۱۸:۳ شرایط را برای افزایش تجمع TAG‌های ۵۴:۹ و انباست آنها در پلاستوگلوبول‌ها و تغییر ترکیب گلیسرول‌لیپیدهای غشا فراهم می‌آورند. از سوی دیگر مطالعات لیپیدومیک نیز همبستگی بین تجزیه مونوگالاكتوزیل دی آسیل گلیسرول‌های^۴ (MGDG) و بیوستز TAG در شبکه آندوپلاسمی را تایید کرد (Higashi et al. 2018). در حقیقت پاسخ اصلی گیاه به تنش گرما در آرابیدوپسیس در مسیر متابولیسم گلیسرول‌لیپیدها به هموستازی لیپیدهای درون سلولی برای حفظ ساختار و عملکرد طبیعی غشاء وابسته است.

بر اساس بررسی مسیرهای متابولیکی در پایگاه داده‌ی DAVID، ۳۰۵ ژن مرتبط با مسیر بیوستز متابولیت‌های ثانویه شناسایی شد (شکل ۵ الف) که ژن‌های پیرولین-۵-کربوکسیلات سیتیتاز^۵ (P5CS) و پیرولین-۵-کربوکسیلات ردوکتاز^۶ (P5CR) که در

¹ Phospholipid metabolic process

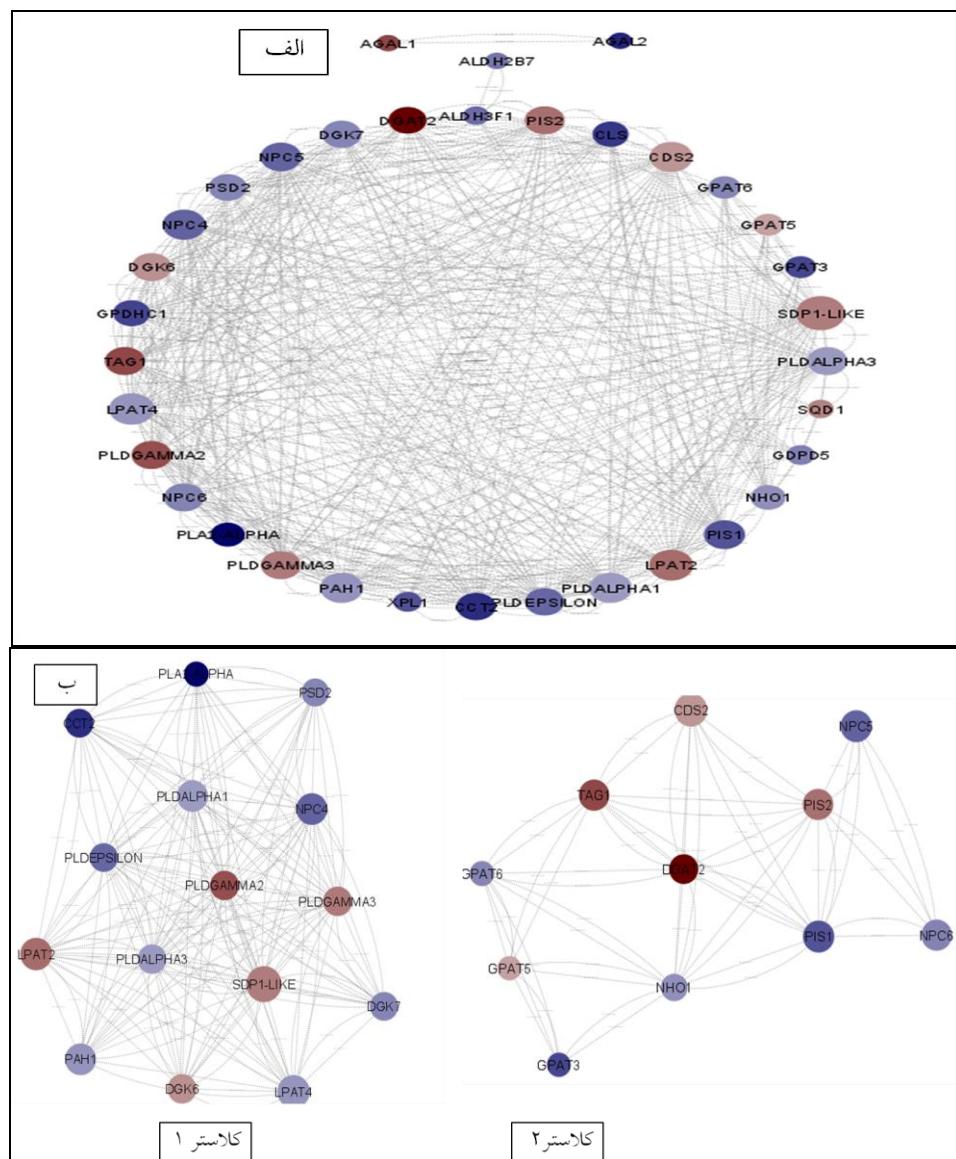
² Cellular lipid metabolic process

³ Lipid metabolic process and lipid biosynthetic process

⁴ Monogalactosyl diacyl glycerol

⁵ Pyrroline-5-carboxylate synthetase

⁶ pyrroline-5-carboxylate reductase



شکل ۴-الف. شبکه‌ی مرتبه با ژن‌های مسیر گلیسروفسفولیپید و گلیسرولیپید و ب. کلاسترها حاصل از این شبکه

جدول ۵- ژن‌های کلیدی با بالاترین مقادیر درجه مرتبه با بیوستر متابولیت‌های ثانویه

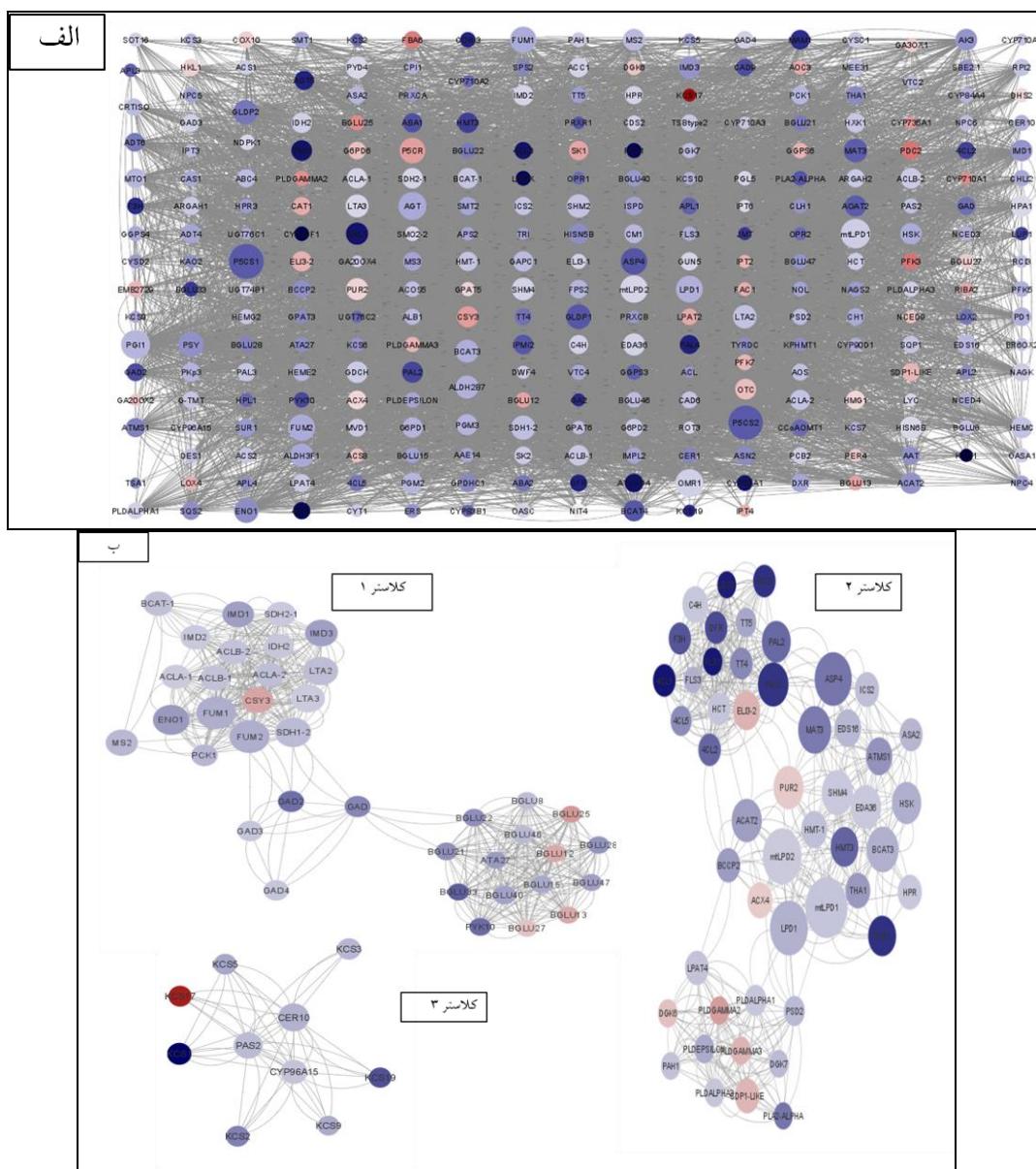
مرکزیت درونی	مرکزیت میانی	درجه ارتباط با گره‌های دیگر	ژن	
۰/۰۱۸۱	۳۱۹۹/۰۰۵۷	۱۸۰	P5CS1	۱
۰/۰۱۱۹	۲۳۰۹/۳۶۶	۱۷۶	P5CS2	۲
۰/۰۰۱۶	۱۹۰۷/۰۱۸۶	۱۴۰	mtLPD1	۳
۰/۰۸۵۴	۳۲۱۲/۹۲۷۵	۱۳۶	PGI1	۴
۰/۰۹۳۴	۱۸۹۱/۸۰۵۴	۱۲۸	AGT	۵
۰/۰۸۷۰	۲۳۱۳/۳۵۳۳	۱۲۸	OMR1	۶

محوری آن در تنظیم پتانسیل احیاء سلولی و تنظیم رشد گیاه

در مجموع این یافته‌ها نشان داد که در مسیر متابولیت‌های ثانویه، پاسخ اصلی گیاه به تنش گرمای، تقویت سنتز پرولین به‌واسطه نقش

گرما با افزایش سیالیت غشاء و از سوی دیگر تولید گونه‌های فعال اکسیژن، پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در ساختار غشاها پلاسمایی را افزایش می‌دهد (Boca et al. 2014)، لذا تغییر ترکیب گلیسرولیپیدهای غشاء پلاسمایی و کاهش غیر اشباع‌سازی آن‌ها جهت پایداری غشاها پلاسمایی، به عنوان یکی از پاسخ‌های سازگاری گیاه به گرما مطرح شده است (Yu et al. 2022). در مطالعه‌ی Higashi et al. (2015) نقش مسیرهای متابولیکی اسیدهای آمینه، متابولیسم لیپیدها و بیوستتر متابولیت‌های ثانویه در پاسخ به تنفس خشکی اشاره شده است.

بر اساس کلاستریندی 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 کربوهیدرات‌ها، ضمن حفظ نقش ساختاری خود در بقاء گیاه، به‌واسطه خصوصیاتی که در مسیرهای سیگنالینگ تنفس‌های Wind گرمایی دارند، در بروز پاسخ‌های سازگاری سهیم هستند (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 تنفس



آوندی و فعال‌سازی پروتئین‌های شوک گرمایی اشاره کرد. همچنین بررسی ژن‌های کلیدی دخیل در متابولیسم فسفوگلیسریدها نشان داد که علاوه بر ژن‌های دخیل در بیوسترن فسفولیپیدها، ژن‌های مؤثر در تجزیه TAG (ناظر SDPIL) نیز در پاسخ به تنش گرما تاثیرگذار هستند. در حقیقت پاسخ اصلی گیاه به تنش گرما در آراییدوپسیس در مسیر متابولیسم گلیسرولیپیدها به هموستانزی لیپیدهای درون سلولی برای حفظ ساختار و عملکرد طبیعی غشاء وابسته است. از سوی دیگر شناسایی ژن‌های کلیدی مؤثر در بیوسترن پروولین (*P5CS2* و *P5CS1*) نشان داد که در مسیر متابولیت‌های ثانویه، پاسخ اصلی گیاه به تنش گرما، تقویت سنتز پروولین بواسطه نقش محوری آن در تعدیل و خشی‌سازی 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.

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 سایتونکین، فرایندهای بیوسترن اسیدهای چرب، نمو ریشه و تمایز سلولی مرتبط می‌باشد. همچنین بر اساس بررسی مسیرهای متابولیکی در پایگاه داده KEGG، مسیرهای انتقال سیگنالی هورمون‌های گیاهی، بیوسترن 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 (ARF5/MP و TIR1) و گیرنده هسیتیدین کینازی مربوط به مسیر سایتونکین (Wol) سبب فعال‌سازی مسیرهای پائین دست و بروز پاسخ‌های تحمل به تنش گرما می‌شود که از آن جمله می‌توان به تنظیم دقیق رشد مربیستم انتهای ساقه و ریشه، رشد هیپوکوتیل، توسعه بافت‌های

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, Saito K (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 monogalactosyldiacylglycerol by liberating α-linoleni

- 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, Riikonen 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 profiling 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) ARF2 coordinates 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 differential 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.

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