

مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی نیم‌رخ بیان ژن گیاهچه‌های آراییدوپسیس

به منظور شناسایی ژن‌های کلیدی پاسخ‌دهنده به تنش گرما

Bioinformatics evaluation of the gene expression profile of *Arabidopsis* seedlings in order to identify heat stress responsive genesمرضیه 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، ملایانی، ایران

۳- استادیار، پژوهشکده آبی 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@asnruk.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 تنش گرما توسعه داده‌اند. در پژوهش حاضر جهت شناخت جنبه‌های مولکولی و بررسی عملکردی تحمل گرمایی، داده‌های ریز آرایه پروفایل بیانی تنش گرما گیاهچه‌های آراییدوپسیس 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 $|\log_2 \text{Fold change}| > 2$ 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، بیوستنژ متابولیت‌های ثانویه و متابولیسم گلیسروفسفولیپیدها تحت تاثیر تنش گرما قرار گرفتند. از بین ژن‌های کلیدی شناسایی شده با درجه ارتباط بالا در ماژول‌ها، ژن‌های *TIR1*، *ARF5/MP* به عنوان گیرنده اکسین، *WOL* به عنوان گیرنده مسیر ساینوکینین، *SDP1L* ژن مؤثر در تجزیه تری آسپیل گلیسرول، *LPAAT2/4* ژن‌های مؤثر در بیوستنژ فسفولیپیدها و ژن‌های مؤثر در بیوستنژ پرولین (*P5CS1* و *P5CS2*) به عنوان ژن‌هایی که نقش کلیدی در پاسخ به تنش گرما دارند، معرفی شدند. بررسی عملکرد این ژن‌ها مشخص کرد که پاسخ‌های سازگاری به تنش گرما عمدتاً به تنظیم رشد مریستم انتهایی ساقه و ریشه، رشد هیپوکوتیل، توسعه بافت‌های آوندی، فعال‌سازی پروتئین‌های شوک گرمایی، تغییر ترکیب لیپیدهای غشاء و تنظیم اکسیداسیون/احیا سلولی مربوط می‌شود. از این رو برنامه‌های اصلاحی جهت تقویت تحمل به گرما بایستی از طریق دست‌کاری اجزای دخیل در این مسیرها صورت گیرد.

واژه‌های کلیدی

آراییدوپسیس

تنش گرما

ریز آرایه

ژن‌های کلیدی

مسیرهای متابولیکی

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 سلسله‌مراتبی 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^۴ پاسخ‌دهنده به تنش برای درک بهتر مکانیسم تنش گرما و توسعه واریته‌های مقاوم استفاده شد.

مواد و روش‌ها

از پایگاه داده‌ی ریزآرایه GEO^۵ (<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.

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 افتراقی^۱ (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"^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 HSF1s 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 HSF1s فعالیت آن جلوگیری می‌کنند. تحت شرایط تنش، HSF1s 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 HsfA4، HsfA5 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 متابولیسمی را در برمی‌گیرد. هرچند نقش ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی به‌خوبی در تنش گرما مشخص

¹ Differentially expressed genes

² Heat stress response (HSR)

³ Heat stress transcription factors (Hsfs)

⁴ Hub genes

⁵ Gene Expression Omnibus

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 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، DNA و ATP و فعالیت فاکتورهای رونویسی می‌باشند. مهم‌ترین عبارت‌ها در فرایندهای بیولوژیکی به تنظیم رونویسی، فرایندهای اکسیداسیون و احیاء و پاسخ به آبنسجیک اسید مربوط می‌شود. در بخش سلولی نیز بیشترین فعالیت به سیتوپلاسم، کلروپلاست، غشای پلاسمایی و پلاسمودسما تا 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).

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

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

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.

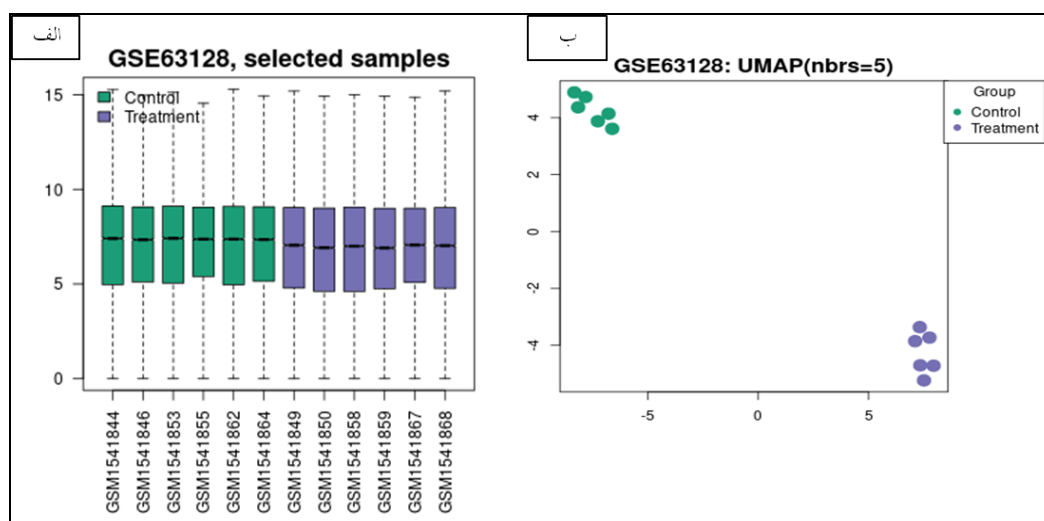
در پایگاه داده‌ی DAVID (Huang et al. 2009) به آدرس بر خط <https://david.ncifcrf.gov> ارزیابی مسیرهای بیولوژیکی و نیز ویژگی‌های ساختاری و عملکردی ژن‌ها انجام شد. نتایج حاصل از ارزیابی‌های انجام شده بر اساس روش‌های آماری مختلف بررسی و بر اساس سطح معنی‌داری ۰/۰۱ گزارش شد. بررسی ارتباط بین ژن‌های با بیان 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 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

¹ Terms

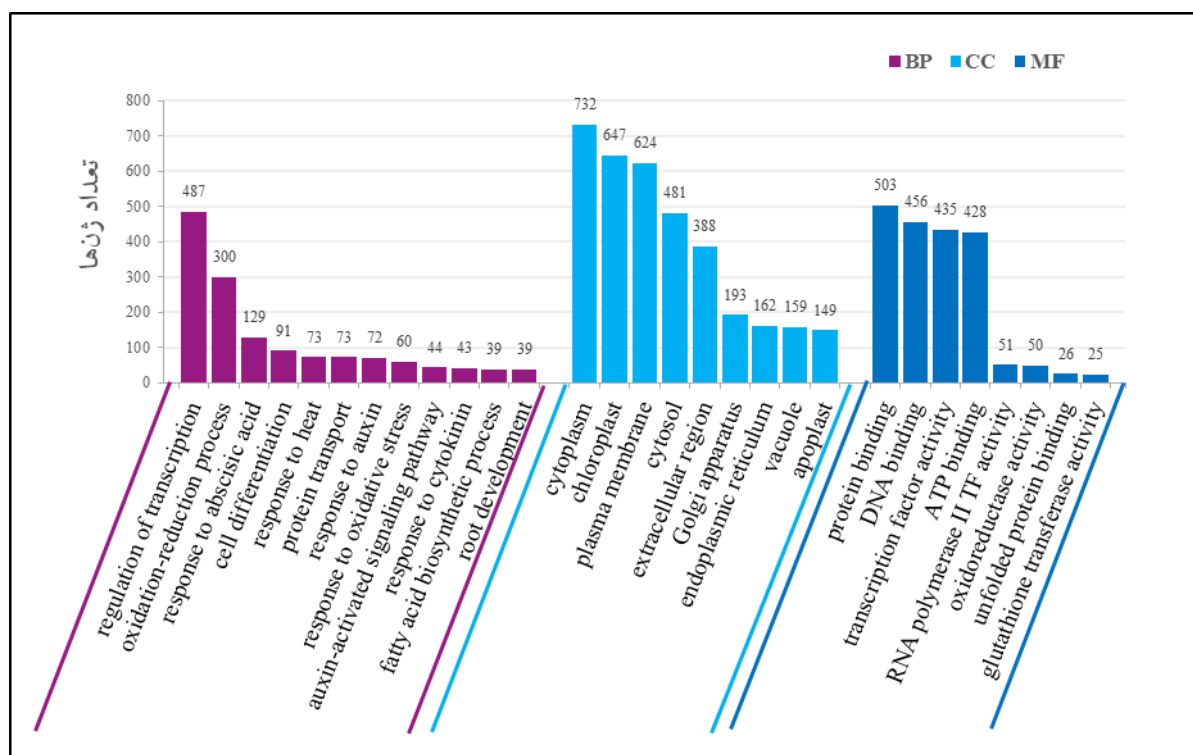
² Biological Process

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 گرما در آرابیدوپسیس

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

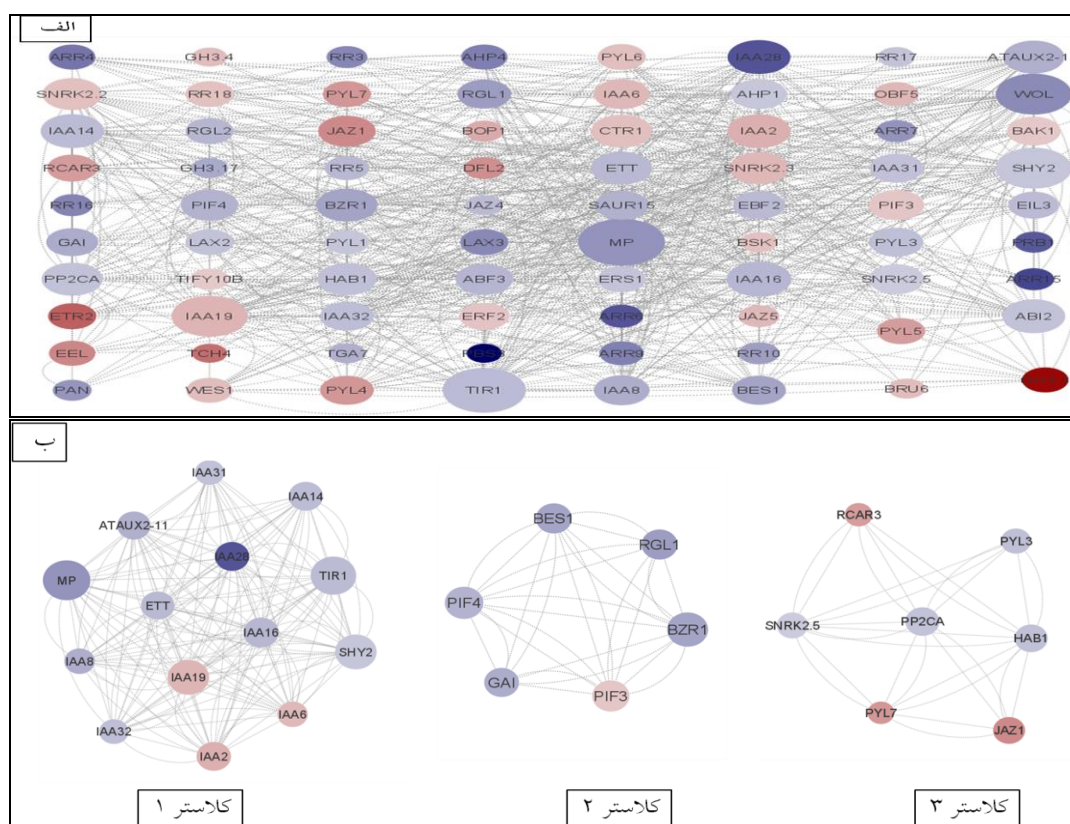
ردیف	مسیر	تعداد ژن‌های شناسایی شده	تعداد کلاسترهای ترسیم شده
۱	انتقال سیگنال هورمون گیاهی	۸۱	۳
۲	بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه	۳۰۵	۵
۳	مسیر گلیسرولفسفولیبید و گلیسرولیبید	۳۶	۲

می‌شود. اما در حضور اکسین، پروتئین بازدارنده 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).

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

¹ Auxin response factor 5/MONOPTROS



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

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

ژن	درجه ارتباط با گروه‌های 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 ۴- ژن‌های کلیدی با بالاترین مقادیر درجه مرتبط با مسیر گلیسروفسفولیپید و گلیسرولیپید

ژن	درجه ارتباط با گروه‌های دیگر	مرکزیت میانی	مرکزیت درونی
SDP1-LIKE	۵۴	۷۶/۰۸۸۷	۰/۳۱۲۵
LPAT4	۴۶	۴۰/۲۵۳۰	۰/۳۰۱۷
LPAT2	۴۴	۳۷/۰۵۵۵	۰/۲۹۹۱
PLDALPHA1	۴۲	۵۳/۹۳۷۷	۰/۲۹۶۶

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)^۱ را کد می‌کند که سیگنال سایتوکینین 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 سایتوکینین 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 سایتوکینین (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 سایتوکینین می‌باشد از یک سو میزان تجمع این هورمون گیاهی را به‌طور موقت تقویت می‌کند و از سوی دیگر اضافی DMDP صرف بیوستنز 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

¹ Arabidopsis Histidin Kinase 4

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

کلاستربندی ژن‌های مرتبط با شبکه‌ی ژنی مسیر انتقال هورمون‌های 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، 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 بیوستنز فسفولیپیدها (LPAAT2/4) به‌عنوان "ژن‌های کلیدی" با بالاترین مقادیر درجه ارتباط با پاسخ به تنش گرما معرفی شدند (جدول ۴). نتیجه‌ی

مسیر بیوستتزی پرولین مشارکت دارند، از "ژن‌های کلیدی" با بالاترین مقادیر درجه ارتباط با مسیر بیوستتزی 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 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). بدین ترتیب که در طول سنتز پرولین با اکسیداسیون NADPH و تولید $NADP^+$ ، فعالیت آنزیم گلوکز-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 آسکوربات/گلوکاتایون 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 پروپانویید 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).

کلاستربندی ژن‌های مرتبط با این شبکه‌ی ژنی منجر به شناسایی دو کلاستر شد که در شکل ۴-ب نشان داده شده‌است. 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 بیوستتزی لیپیدها^۳ در صدر گروه‌بندی قرار گرفتند.

در مطالعه Higashi et al. (2015) مشخص شد که علاوه بر تقویت بیان ژن‌های مؤثر در بیوستتزی 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 ۵۴:۹ تری‌آسیل‌گلیسرول‌های متشکل از اسیدهای چرب اسید لینولنیک ۱۸:۳ 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. به عبارت دیگر لیپازهایی که تحت تنش گرما القاء می‌شوند در کاتابولیسم گلیسرولیپیدهای غشاء نقش دارند و با جداسازی اسیدهای چرب ۱۸:۳ شرایط را برای افزایش تجمع TAGهای ۵۴:۹ 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^۴ (MGDG) و بیوستتزی 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، ۳۰۵ ژن مرتبط با مسیر بیوستتزی متابولیت‌های ثانویه شناسایی شد (شکل ۵ الف) که ژن‌های پرولین-۵-کربوکسیلات سینتتاز^۵ (P5CS) و پرولین-۵-کربوکسیلات ردوکتاز^۶ ($P5CR$) که در

^۱ Phospholipid metabolic process

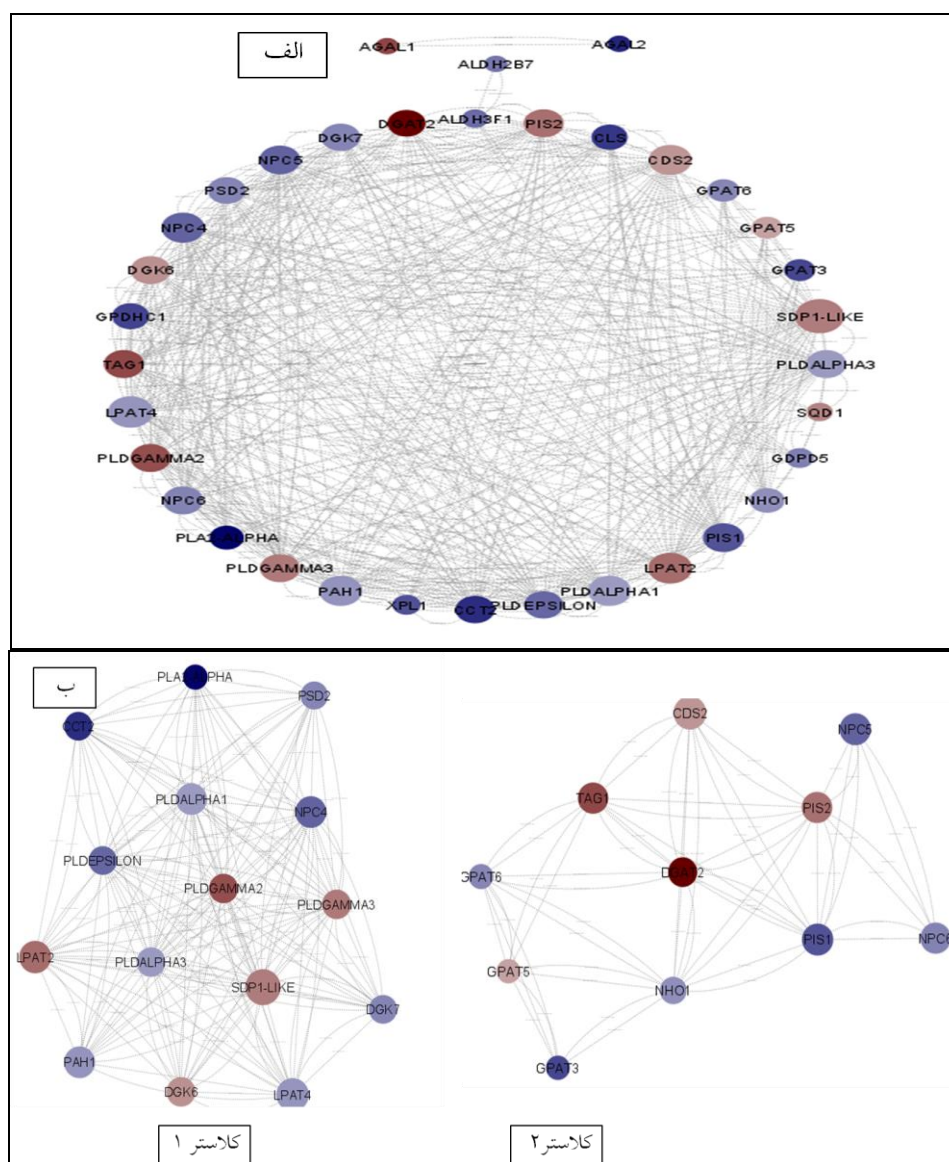
^۲ Cellular lipid metabolic process

^۳ Lipid metabolic process and lipid biosynthetic process

^۴ Monogalactosyl diacyl glycerol

^۵ Pyrroline-5-carboxylate synthetase

^۶ pyrroline-5-carboxylate reductase



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

جدول ۵- ژن‌های کلیدی با بالاترین مقادیر درجه مرتبط با بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه

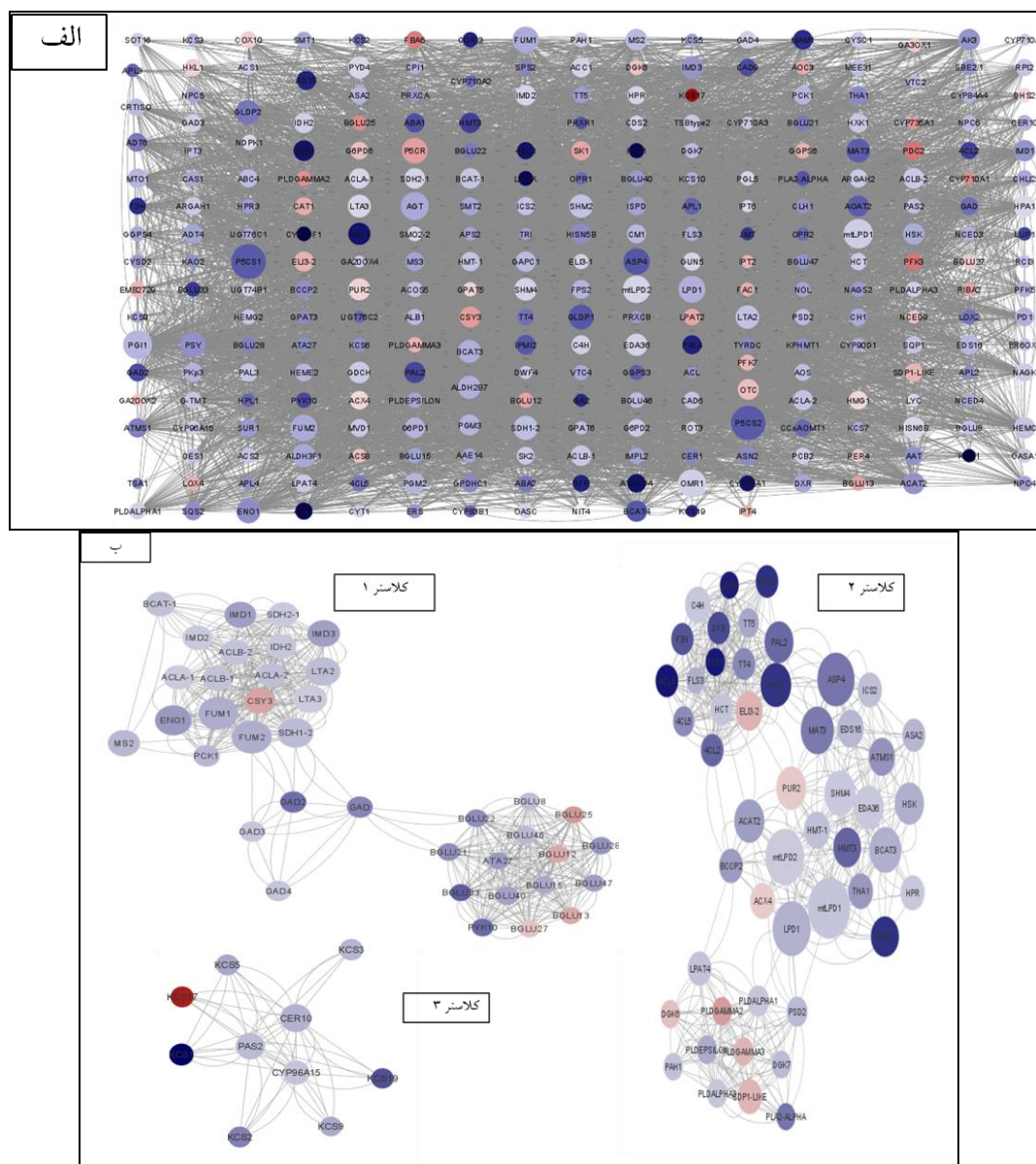
ژن	درجه ارتباط با گره‌های دیگر	مرکزیت میانی	مرکزیت درونی
P5CS1	۱۸۰	۳۱۹۹/۵۵۵۷	۰/۵۱۸۱
P5CS2	۱۷۶	۲۳۰۹/۳۶۶	۰/۵۱۱۹
mtLPD1	۱۴۰	۱۹۰۷/۵۱۸۶	۰/۵۰۱۶
PGI1	۱۳۶	۳۲۱۲/۹۲۷۵	۰/۴۸۵۴
AGT	۱۲۸	۱۸۹۱/۸۰۵۴	۰/۴۹۳۴
OMR1	۱۲۸	۲۳۱۳/۳۵۳۳	۰/۴۸۷۰

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

محوری آن در تنظیم پتانسیل /حیاء سلولی و تنظیم رشد گیاه می‌باشد.

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.

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 کربوهیدرات‌ها، ضمن حفظ نقش ساختاری خود در بقاء گیاه، به‌واسطه خصوصیتی که در مسیرهای سیگنالینگ تنش‌های گرمایی دارند، در بروز پاسخ‌های سازگاری سهم 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



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

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 سایتوکینین، 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 (ARF5/MP و TIR1) و گیرنده هستیتیدین‌کینازی مربوط به مسیر سایتوکینین (Wol) سبب فعال‌سازی مسیرهای پائین دست و بروز پاسخ‌های تحمل به تنش گرما می‌شود که از آن جمله می‌توان به تنظیم دقیق رشد مریستم انتهایی ساقه و ریشه، رشد هیپوکوتیل، توسعه بافت‌های

آوندی و فعال‌سازی پروتئین‌های شوک گرمایی اشاره کرد. همچنین بررسی ژن‌های کلیدی دخیل در متابولیسم فسفولیپیدها، 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 آرآیدوپسیس 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 $\delta 1$ -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 monogalac-tosyldiacylglycerol 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, Bäuml 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