ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٦
صفحه ٥٢٦ - ٥١٧

مقایسه ترانسکریپتوم گیاه جو (*Hordeum vulgare* L.) رقم افضل در پاسخ به تنش شوری با استفاده از تکنیک RNA-Seq

Differential gene expression analysis on Afzal genotype of barley due to long-term salinity stress by RNA-Seq

فرزانه کوهزادی[1]، محمد فارسی*[1]، عبدالرضا باقری[1]، منصور امیدی[2]، توماس گیرکی[3]، هوشنگ علیزاده[2]

١- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

٢- به‌ترتیب استاد، استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

٣- استاد، دپارتمان ژنومیکس، دانشگاه کالیفرنیا ریورساید، کالیفرنیا، آمریکا

Koohzadi F[1], Farsi M[*1], Bagheri A[1], Omidi M[2], Girke T[3], Alizadeh H[2]

1- PhD student, Professors, Department of Biotechnology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2- Professor, Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Tehran University, Karaj, Iran
3- Professor, Department of Genomics, University of California Riverside, California, USA

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: farsi@um.ac.ir

(تاریخ دریافت: ٩٦/٩/١٧ - تاریخ پذیرش: ٩٦/١٢/١٣)

چکیده

تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که منجر به کاهش رشد و عملکرد گیاهان زراعی می‌شود. برای زنده ماندن در چنین شرایطی، گیاهان باید بتوانند به سرعت به تنش شوری پاسخ دهند. مطالعات مولکولی در گیاهان مختلف نشان می‌دهد که این مکانیسم شامل شبکه‌های پیچیده‌ای از تنظیم بیان ژن است. یکی از غلات مهم زراعی که به‌عنوان گیاهی متحمل به شوری در بین خانواده گندمیان شناخته می‌شود گیاه جو می‌باشد. این تحقیق به‌منظور مقایسه الگوی بیان ژن‌های پاسخ دهنده به تنش بلند مدت شوری در رقم افضل، یکی از ارقام مقام جو کشور، انجام شد. به‌منظور اعمال تنش شوری، از آب‌شور حاصل از NaCl با EC حدود ١٢ دسی زیمنس بر متر برای آبیاری استفاده شد. RNA گیاه جو با کیت Trizol از گیاهان تحت تنش شوری و کنترل استخراج و سپس کتابخانه‌های cDNA تهیه و توالی‌یابی با استفاده از پلت فرم Illumina/HiSeq انجام شد. تجزیه‌های RNA-Seq با استفاده از پکیج systemPipeR، انجام شد. نتایج مقایسه بیان ژن نشان داد پس از اعمال تنش شوری ٦٨٣ ژن با FC >1.5 و FDR<0.05 به‌طور معنی‌داری تغییر بیان یافتند. تجزیه‌های بیوانفورماتیک نشان داد که ژن‌های تغییر بیان یافته در ارتباط با فرایندهای مختلفی هم‌چون تبادل آنیون، فعالیت آنتی‌پورترها، ترانسپورترهای یون سدیم، انتقال یون‌های فلزی توسط فعالیت حامل‌های ترانس ممبران، فعالیت گزارشگر ترانس ممبران و طیف وسیعی از آبشارهای کینازی و فسفاتازی می‌باشند. حجم زیاد اطلاعات به‌دست آمده در این تحقیق می‌تواند به‌عنوان منبع اطلاعاتی ارزشمند در مطالعات آتی به‌منظور دستورزی‌های ژنتیکی گیاه جو و تولید ارقام متحمل به شوری استفاده شد.

واژه‌های کلیدی

افضل
ترانسکریپتوم
جو
شوری
RNA-Seq

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.3.9]

مقدمه

در اغلب مواقع گیاهان در معرض انبوهی از شرایط تنش‌زا می‌باشند که آن‌ها را از رسیدن به حداکثر پتانسیل ژنتیکی خود باز می‌دارد. در واقع تنش‌های غیر زنده، علت اصلی بیش از ۵۰ درصد کاهش عملکرد، در اغلب گیاهان زراعی دنیا است که مهم‌ترین آن شامل تنش‌های خشکی، شوری و سرما می‌باشد (Forster et al. 2000; Waller et al. 2005). امروزه وجود پدیده گرم شدن کره زمین همراه با کاهش منابع آب برای کشاورزی منجر به افزایش شوری زمین‌های کشاورزی شده‌است که این پدیده تهدیدکننده امنیت غذایی در زمان حال و آینده خواهد بود (Parihar et al. 2015). از آنجایی که در شرایط یکسان تنش شوری برخی از گیاهان تحمل بیش‌تری به شرایط شوری دارند و عملکرد آن‌ها به اندازه برخی دیگر کاهش نمی‌یابد، لذا یکی از راهکارهای پایدار و اقتصادی برای رویارویی با تنش شوری مطالعه دقیق‌تر پروفایل‌های بیانی این گیاهان با روش‌های جدید مقیاس بزرگ و امیکس و به‌کارگیری ژن‌های شناسایی شده جهت دستورزی‌های ژنتیکی می‌باشد (Golldack et al. 2014; Ali et al. 2014). جو (*Hordeum vulgare* L.) چهارمین محصول زراعی مهم دنیا پس از برنج، گندم و ذرت و دومین محصول زراعی مهم در ایران پس از گندم می‌باشد که معمولا به‌عنوان غذای انسان، مالت و خوراک دام استفاده می‌شود (Gozukirmizi and Karlik 2017). جو دارای سازگاری وسیع اکولوژیکی بوده و نسبت به سایر گیاهان خانواده غلات تحمل بیش‌تری نسبت به خشکی، شوری و قلیائیت خاک دارد. محققین اعتقاد دارند که با گرم شدن زمین و مشکلات ناشی از تغییرات اقلیم، کشت و کار جو، به علت سازگاری بیش‌تر آن به شرایط آب و هوائی سخت و خشن گسترش بیش‌تری خواهد یافت (Ahmed et al. 2015; Roy et al. 2014). شوری منجر به تنش اسمزی، سمیت یونی و کمبود مواد غذایی در گیاهان می‌شود. مقدار شوری بالاتر از سطح آستانه، منجر به تخریب مولکولی، توقف رشد و حتی مرگ گیاه می‌شود و در شوری‌های پایین‌تر از سطح آستانه، رشد گیاه کند شده و عملکرد به‌شدت کاهش می‌یابد. گیاهان سعی می‌کنند با ایجاد تغییرات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی که به‌واسطه تغییر در بیان ژن‌هایی که پروتئین‌ها و متابولیت‌های ویژه‌ای را کد می‌کنند، در برابر تنش شوری مقاومت کنند (Yamaguchi and Blumwald 2005; Castillo et al. 2007). تا کنون تلاش‌های زیادی برای درک مکانیسم مولکولی تحمل به تنش شوری صورت گرفته است. در چند دهه گذشته، بررسی پاسخ گیاهان به تنش شوری یکی از موضوعات مهم در مطالعات روش‌های با مقیاس بزرگ[1]، مانند تجزیه کل ترانسکریپتوم، پروتئوم و متابولوم بوده است. این مطالعات موجب شناسایی مسیرهای انتقال سیگنال و تحمل در برابر شوری شده‌است (Peng et al. 2009). طی این مطالعات مشخص شده‌است که تنش شوری در ثبات یونی سلول و هم‌چنین ثبات اسمزی سلول اختلال ایجاد می‌کند. تجمع یون‌های Na^+ و Cl^- منجر به تغییر فضایی ساختمان پروتئین‌ها و تغییر در پتانسیل الکتریکی غشای پلاسمایی می‌شود. این عوامل به‌عنوان پیامرسان‌های اولیه در تنش شوری شناخته می‌شوند (Qiu et al. 2004; Hauser and Horie 2010). تجمع Ca^{2+} در سیتوزول به‌عنوان پیام رسان‌های ثانویه در تنش شوری عمل می‌کنند. حسگرهای کلسیم، آغازکنندهٔ واکنش‌های آبشاری فسفریالسیون هستند که پیامد آن فعال شدن ژن‌های دخیل در پاسخ به تنش و عوامل رونویسی است که در نهایت منجر به افزایش سازگاری گیاه به تنش شوری می‌شود (Mahajan et al. 2008). مسیر سیگنالی SOS[2] یکی از مسیرهای بیوشیمیایی اختصاصی در تنش شوری است که اجزای آن ژن‌های SOS1، SOS2 و SOS3 می‌باشد که در واقع حسگرهای میزان کلسیم سلول هستند. به‌طور کلی مسیر SOS در پاسخ به تنش یونی ناشی از تنش شوری فعال می‌شود و مسیرهای پروتئین کینازی غیر وابسته به SOS در پاسخ به تنش اسمزی ناشی از تنش شوری فعال می‌شوند (Qiu et al. 2002; Zhu 2001). در تحقیقی پروفیل ترانسکریپتوم دو ژنوتیپ جو Hua11 و Hua30 که به‌ترتیب ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به شوری هستند در پاسخ به تنش شوری با استفاده از ریزآرایه‌های cDNA مقایسه شد. در مجموع، به‌ترتیب ۵۵۷ و ۲۴۷ ژن پاسخ دهنده به شوری در بافت ساقه و ریشه در ژنوتیپ متحمل به شوری بیان شد. در این میان، تعدادی از این ژن‌ها مربوط به انتقال سیگنال تنش شوری و تعدادی از

[1] High throughput
[2] Salt overly sensitive

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.3.9]

آن‌ها نیز مربوط به فاکتورهای رونویسی بودند. مشخص شد ژن LysM RLK مهم‌ترین ژن پاسخ دهنده به تنش شوری می‌باشد. علاوه بر این، در ژنوتیپ مقاوم آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز اسید جاسمونیک، متابولیسم لیپیدها و هموستازی ایندول-۳-استیک اسید به‌طور خاصی تحت تاثیر تنش شوری قرار گرفتند (Gao et al. 2013).

امروزه، که کمتر از یک دهه از آن سپری شده‌است، روی کار آمدن توالی‌یابی نسل جدید (NGS) و الگوریتم‌های جدید محاسباتی، منجر شد که توالی‌یابی در مقیاس بزرگ امری معمول در تحقیقات شود (Mardis 2008). با استفاده از تکنیک NGS می‌توان میلیاردها خوانش کوتاه را به‌طور موازی توالی‌یابی کرد. در حال حاضر، RNA-seq (توالی‌یابی RNA با استفاده از روش‌های توالی‌یابی NGS) یکی از محبوب‌ترین موضوعات در حیطه NGS می‌باشد که به سرعت جایگزین سایر روش‌های تعیین پروفایل ترنسکریپتوم در مقیاس بزرگ مانند ریزآرایه و SAGE شده‌است (Willenbrock et al. 2009). در تحقیقی که با استفاده از روش RNA-Seq بر روی جو وحشی (*Hordeum spontaneum*) از اجداد جو زراعی کشت شده (*Hordeum vulgare*) انجام شد جو وحشی تحت تیمار شوری ۵۰۰ میلی‌مولار NaCl در چهار مرحله زمانی مختلف قرار گرفتند. مهم‌ترین گروه‌های ژنی پاسخ‌دهنده به شوری شامل، ژن‌های پاسخ‌دهنده به محرک‌های خارجی و گروه‌های ژنی مرتبط با حامل‌های الکترون بود. هم‌چنین مشخص شد که رونوشت‌هایی که دارای افزایش بیان معنی‌داری بودند در فرایندهای بیولوژیکی مختلف شامل انتقال دهنده‌های الکترون، بیوسنتز فلاونوئیدها، گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، تولید اتیلن، شبکه‌های سیگنالینگ و فولدینگ پروتئین درگیر می‌باشند (Bahieldin et al. 2015).

اگرچه مطالعات گسترده‌ای به‌منظور شناسایی تمام ژن‌های موجود در مسیر سیگنال دهی تنش شوری انجام شده‌است و موفقیت‌های چشمگیری نیز حاصل شده‌است، ولی هنوز درک کاملی از مسیرهای بیولوژیک مقاومت به‌دلیل کاستی‌های موجود در مسیرهای شناسایی شده و مسیرهای بینابینی شناسایی نشده، وجود ندارد. لذا این تحقیق با هدف شناسایی، بررسی و مقایسه الگوی بیان ژن‌های دخیل در تحمل به تنش شوری در گیاه جو و مقایسه مکانیسم پاسخ به شوری نسبت به شرایط کنترل با استفاده از روش RNA-Seq و الگوریتم‌های کامپیوتری موجود انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از گیاه جو رقم افضل که بر پایهٔ آزمایش‌های پیشین به‌عنوان گونهٔ مقاوم به شوری شناسایی شده بود، استفاده شد و به‌صورت دو آزمایش جداگانه یکی تحت تنش شوری و دیگری بدون تنش، در مزرعه ایستگاه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی نیشابور اجرا شد. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. هدایت الکتریکی (EC)[1] آب آبیاری در شرایط نرمال dsm^{-1} ۰/۷ و در شرایط شور حدود dsm^{-1} ۱۱-۱۲ بود که از طریق حل کردن نمک NaCl در آب، این میزان EC حاصل شد. تنش شوری به‌صورت طولانی مدت و تا مرحله رشد ادامه یافت و سپس نمونه‌برداری از برگ پرچم انجام شد.

جهت تأیید اعمال تنش غلظت یون‌های Na^+ و K^+ با استفاده از فلیم‌فتومتر اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۰/۵ گرم برگ خشک شده با استفاده از هاون پودر شد. سپس در کوره با دمای ۵۸۰ درجهٔ سلسیوس به مدت چهار ساعت قرار گرفت. به نمونه‌های خاکستر شده ۱۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۲ نرمال اضافه شد و پس از عبور از کاغذ صافی، محلول نهایی به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد و با استفاده از دستگاه فلیم فتومتر غلظت هر نمونه نسبت به منحنی استاندارد خوانده شد (Hald et al. 1947).

برگ پرچم گیاهان تحت تنش و کنترل پس از نمونه‌برداری درون نیتروژن مایع قرار گرفت و تا هنگام استخراج RNA به فریزر ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شد. استخراج RNA با استفاده از محلول TRIzol (Invitrogen) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد و سپس RNA استخراج شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل الکتروفورز، دستگاه نانودراپ و دستگاه بیوآنالایزر Agilent 2100 ارزیابی شد. ساخت کتابخانهٔ cDNA و توالی‌یابی توسط انستیتو ژنومیکس پکن (BGI) و با استفاده از پلاتفرم Illumina HiSeq2000 انجام شد.

[1] Electrical Conductivity

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.3.9]

تجزیه خوانش‌های RNA-Seq با استفاده از بسته نرم‌افزاری SystemPipeR، یکی از بسته‌های موجود در وب‌سایت Bioconductor نوشته شده با زبان برنامه‌نویسی R، انجام شد (Girke 2015). توالی مربوط به ژنوم جو (*Hordeum vulgare*) با کد Hv_IBSC_PGSB_v2 از پایگاه اینترنتی پلنت انسمبل (http://plants.ensembl.org) دانلود شد و به‌عنوان ژنوم مرجع برای تجزیه خوانش‌ها استفاده شد. هم‌چنین فایل GTF که مربوط به انوتیشن ژنوم گیاه جو و موقعیت ژن‌ها، اگزون‌ها، اینترون‌ها و رخدادهای اسپلایسینگ در آن می‌باشد از همین پایگاه دانلود شد. مراحل تجزیه به این شرح بود که ابتدا داده‌های نمونه‌های سفارش داده شده از وب‌سایت انستیتو ژنومیکس پکن (www.genomics.cn) دانلود شد. فرمت خوانش‌ها به صورت fastq بود. کنترل کیفیت خوانش‌ها با نرم‌افزار fastQC برای هر یک از کتابخانه‌های ایجاد شده انجام شد. سپس بر اساس آن پردازش خوانش‌ها با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic انجام شد (Bolger et al. 2014) و خوانش‌های با کیفیت پائین و توالی‌های مربوط به ساخت کتابخانه حذف شدند. در این آزمایش کیفیت Q>30 برای گزینه‌های[1] موجود در نرم‌افزار Trimmomatic از جمله LEADING, TRAILING, AVGQUAL در نظر گرفته شد و بخشی از خوانش‌ها با گزینه HEADCROP حذف شد. پس از اعمال پردازش با استفاده از گزینه‌های ذکر شده داده‌های تمیز[2] به‌دست آمد. سپس خوانش‌های پیرایش شده مربوط به نمونه‌های تحت تنش شوری و کنترل به‌صورت جداگانه بر روی ژنوم مرجع جو با استفاده از نرم‌افزار Bowtie2/Tophat2 منطبق شد (Kim et al. 2013). تنظیمات مربوط به نرم‌افزار Tophat2 در فایل tophat.param تعریف شد. خروجی به‌صورت فایل SAM و BAM بود. سپس سیمبلیک لینک جهت مشاهده نتایج در IGV ایجاد شد. بازسازی ترانسکریپتوم و شمارش خوانش‌ها با استفاده از تابع summarizeOverlaps انجام شد. تجزیه مقایسه‌ای ژن‌های بیان شده[3] (DEG) با متد GLM و با استفاده از نرم‌افزار edgeR انجام شد (Robinson et al. 2010). GOهای مربوط به ژن‌ها از پایگاه داده biomaRt به‌دست آمد. تجزیه گروهی تمام GOهای به‌دست آمده با استفاده از تابع GOCluster Report انجام شد. در نهایت رسم کلاستر و pheatmap برای DEGs به‌دست آمده با ماتریس بیان اصلاح شده (rlog) با استفاده از کتابخانه pheatmap انجام شد. در این روش ماتریس فاصله با استفاده از همبستگی پیرسون و اتصال خوشه‌ها به یکدیگر به‌صورت لینکج کامل محاسبه شد (Girke 2015). هم‌چنین جهت بررسی بیش‌تر GOهای به‌دست آمده و رسم pathwayها و قابل مشاهده سازی آن‌ها از وب‌سایت AgriGO استفاده شد (Tian et al. 2017).

نتایج و بحث

نتایج تایید کننده وجود تفاوت معنی‌دار غلظت یونهای Na^+ و K^+ و هم‌چنین نسبت یون‌ها K^+/Na^+ در نمونه‌های برگ پرچم در حضور شوری در مقایسه با تیمار بدون شوری در سطح احتمال ۱ درصد بود. اعمال تیمار شوری سبب افزایش غلظت یون سدیم در بافت برگ شد، این در حالی بود که غلظت یون پتاسیم در تیمار شوری نسبت به تیمار شاهد کاهش نشان داد که این نتایج بیانگر اعمال تنش شوری در گیاه مورد آزمایش می‌باشد. در غلات مقادیر کم سدیم برگ و مقادیر بالای نسبت یون K^+/Na^+ به‌عنوان یک شاخص مهم در انتخاب گیاهان متحمل نسبت به گیاهان حساس به شوری به‌شمار می‌آید. افزایش میزان یون سدیم و کاهش نسبت یون K^+/Na^+ در گیاهان قرارگرفته در معرض تنش شوری در منابع توسط Hauser and Horie Chen et (2010) al. (2007) نیز گزارش شده‌است.

نتایج کنترل کیفیت RNA، نشان‌دهنده مطلوب بودن کیفیت RNA استخراج شده به‌منظور ساخت کتابخانه cDNA جهت توالی‌یابی بود. در بررسی کیفیت RNA با استفاده از ژل اگارز طبق انتظار سه باند 28S, 18S, 5S مشاهده شد که نشان دهنده کیفیت RNA استخراج شده می‌باشد. در تجزیه تعیین خلوص و کمیت RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ، نمونه‌هایی که نسبت‌های جذب ۲۶۰/۲۸۰ و جذب ۲۶۰/۲۳۰ در آن‌ها نزدیک به عدد ۰/۱ ± ۲ و کمیت آن‌ها بالای ۳۰ µg/µl بود انتخاب شد و جهت توالی‌یابی ارسال شدند. یکی دیگر از شاخص‌های استفاده شده در بررسی کیفیت RNA استخراج شده عدد RIN بود که شرکت مربوطه

[1] Options
[2] Clean
[3] Differentially expressed genes

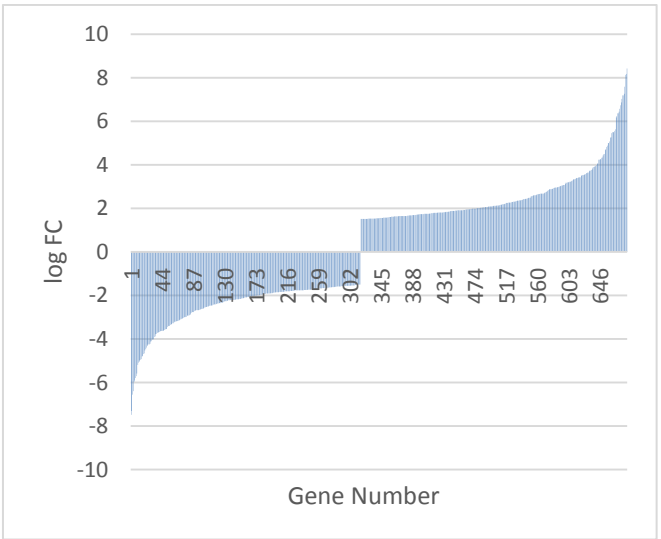
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.3.9]

جهت بررسی کیفیت RNA ارسال شده با استفاده از دستگاه بیوآنالایزر انجام داد. RIN شاخصی برای بررسی میزان تجزیه شدن RNA می‌باشد که محدوده بین ۱ تا ۱۰ دارد. اعداد بزرگ‌تر نشان دهنده کیفیت بالاتر و تخریب کمتر RNA استخراج شده می‌باشد. لذا از بین نمونه‌های ارسال شده نمونه‌هایی که دارای RIN بزرگ‌تر از ۷ بودند انتخاب شد و جهت توالی‌یابی سفارش داده شد.

تعداد خوانش‌های موجود برای هر یک از نمونه‌های توالی‌یابی شده حدود ۵۰،۰۰۰،۰۰ خوانش با طول ۱۵۰ نوکلئوتید و به صورت paired-end بود. نتایج ارزیابی کیفیت خوانش‌ها با نرم‌افزار fastQC نشان داد که به‌طور کلی خوانش‌ها کیفیت لازم برای انجام تجزیه‌های پایین دستی را دارند ولی با این وجود برای به‌دست آوردن حداکثر کیفیت، خوانش‌های با کیفیت نامطلوب با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic حذف شد (Bolger et al. 2014). پس از اعمال پردازش داده‌های تمیز[1] به‌دست آمد که نتایج ارزیابی مجدد با استفاده از نرم‌افزار fastQC نیز نشان‌دهنده همین مطلب بود. نتایج منطبق کردن خوانش‌های پیرایش شده با ژنوم مرجع جو با استفاده از نرم‌افزار Bowtie2/Tophat2 نشان داد که بیش از ۷۰ درصد خوانش‌ها بر ژنوم مرجع منطبق شد. نتایج تجزیه مقایسه‌ای ژن‌های بیان شده با استفاده از نرم‌افزار edgeR نشان داد که ۶۸۳ ژن دارای تغییرات معنی‌دار با FDR=0.05 و logFC=1.5 می‌باشند. از این میان ۳۱۶ ژن کاهش بیان بین ۱/۵- تا ۸- برابری و ۳۶۷ ژن افزایش بیان بین ۱/۵+ تا ۸+ برابری داشتند (شکل ۱). هم‌چنین برای رسم pathwayها از وب‌سایت AgriGO جهت بررسی بیش‌تر GOهای به‌دست آمده استفاده شد. AgriGO نرم‌افزار و پایگاه داده مبتنی بر وب جهت تجزیه و تفسیر ژن‌های بیان شده می‌باشد. فعالیت این وب‌سایت بر شناسایی pathwayهای مربوط به ارقام زراعی متمرکز شده‌است و دارای محیطی کاربر پسند می‌باشد که با هدف حمایت از جامعه محققین کشاورزی در حوزه تجزیه‌های GO طراحی شده‌است (Tian et al. 2017).

نتایج بررسی Gene Ontology با استفاده از وب‌سایت AgriGO و آپشن Singullar Enrichment Analysis نشان داد که به اغلب این ژن‌ها حداقل یک GO الصاق شد و ۵۵ عدد از آن‌ها دارای GO معنی‌دار با سطح معنی‌داری FDR=0.05 بود.

[1] Clean



شکل ۱- نتایج تجزیه مقایسه‌ای ژن‌های بیان شده با استفاده از نرم‌افزار edgeR. ۶۸۳ ژن دارای تغییرات معنی‌دار با FDR=0.05 و logFC=1.5. در دامنه ۸- تا ۸+ می‌باشند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.3.9]

به‌طور کلی نتایج در سه گروه اصلی، فرایندهای بیولوژیک[1]، عملکردهای مولکولی[2] و اجزای سلولی[3] ارایه شد. بررسی‌ها نشان داد که بیش‌تر ژن‌های تغییر بیان یافته مربوط به گروه عملکردهای مولکولی بود که خود به چندین زیر گروه اصلی و فرعی تقسیم می‌شدند. زیر گروه‌های اصلی مربوط به مسیرهای هیدرولاز، فعالیت فسفاتازها، فرایندهای تشکیل دیواره سلولی، فعالیت‌های آنتی اکسیدانتی و پروسه‌های اتصال می‌باشند. از جمله ژن‌های تغییر بیان یافته در این گروه ژن‌های موجود در مسیر پروتئین سرین/ترئونین فسفاتاز (FDR=1.3e^{-6}) (GO:0004722) می‌باشد شامل ژن *MLOC_15081* با UniProtID: M0UWN5 با افزایش بیان ۳/۱ برابری و سطح معنی‌داری (FDR=1.1e^{-3}) و هم‌چنین ژن *MLOC_15065* با UniProtID: M0X0K6 با افزایش بیان ۲/۸۶ برابری و سطح معنی‌داری (FDR=1.9e^{-10}) می‌باشد. نقش گروه ژنی پروتئین سرین/ترئونین فسفاتاز در سیگنالینگ استرس توسط محققان زیادی بررسی و اثبات شده‌است (País et al. 2009; Cui et al. 2013). فرایندهای آنتی‌اکسیدانت (GO: 0015380) (FDR=2.1e^{-4})، فعالیت آنتی‌پورترها (FDR=1.7e^{-5}) (GO:0015297) انتقال یون‌های فلزی توسط فعالیت حامل‌های ترانس ممبران (FDR=1.2e^{-3}) (GO:0046915)، فعالیت گزارشگر ترانس ممبران و غیره از جمله GOهای مشاهده شده می‌باشند که به لحاظ نسبت حضور افزایش معنی‌داری داشتند. در گروه فرایندهای بیولوژیک، متابولیسم تری گلیسریدها (FDR=8.1e^{-3}) (GO:0006641)، ترانسپورتر یون سدیم (FDR=1.5e^{-2}) (GO:0006814) ارگانیزیشن دیواره سلولی (FDR=1.5e^{-2}) (GO:0071555) و در نهایت در گروه اجزای سلولی، بیش‌ترین تغییرات مربوط به مناطق خارج سلولی (FDR=8.7e^{-4}) (GO:0005576) بود. تنش اکسیداسیونی یک از اثرات جانبی تنش شوری بر روی گیاهان بوده که به‌واسطه میزان بالای اسمز و سمیت ناشی از یون سدیم ایجاد می‌شود و متعاقب آن منجر به تولید مولکول‌های اکسیژن فعال مانند هیدروژن پراکسید، رادیکال‌های هیدرواکسید و آنیون‌های سوپراکسید می‌شود. تجزیه گونه‌های فعال اکسیژن با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت هم‌چون سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون ترانسفراز، پراکسیداز و ترکیباتی هم‌چون پرولین انجام می‌شود (Qiu et al. 2002; Zhu 2001). نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان داد که ژن‌هایی با عملکرد ترانسپورترهای یون سدیم از جمله ژن‌های *MLOC_74633* افزایش بیان ۱/۷ برابری با سطح معنی‌دار FDR=3.5e^{-7} و ژن *MLOC_7811* افزایش بیان ۱/۸ برابری با سطح معنی‌دار FDR=2.7e^{-3} با شماره (GO:0006814) به‌طور معنی‌داری افزایش بیان داشتند. هم‌چنین گروه ژنی پروتئین سرین/ترئونین فسفاتاز (GO:0004722) (FDR=1.3e-6) نیز افزایش بیان چشمگیری داشت. نقش پروتئین کینازهای سرین–ترئونین فسفاتازها در تنش‌های شوری در مطالعات مختلفی گزارش شده‌است. در این تحقیق بیان پروتئین کینازهای سرین– ترئونین فسفاتازها در رقم افضل که به‌عنوان رقم مقاوم به شوری شناخته می‌شود، افزایش معنی‌داری داشت. SOS1 دارای فعالیت تبادل Na^+/H^+ است که این انتقال فعال برای جریان سدیم در سلول های گیاهی ضروری است و طی آن مسیر SOS[4] شامل پروتئین کینازهای سرین–ترئونین و کلسیم باندینگ پروتئین‌ها[5] فعال می‌شوند (Nirmala et al. 2006). فعالیت این مسیر در نهایت منجر به فعال شدن برخی ترانسپورترها خواهد شد. تنش‌های محیطی باعث القای ورود یون کلسیم از طریق مسیر آپوپلاست یا منافذ دیگر به سیتوپلاسم شده، که این کانال‌های ورود کلسیم یک نوع حسگر برای درک تنش می‌باشند. در نتیجه مسیر یونی تنش شوری مسیر SOS که وابسته به کلسیم است فعال می‌شود. هدف این نوع مسیر انتقال یون‌هایی است، که کنترل هموستازی یون‌ها تحت تنش شوری را بر عهده دارند. تحقیقات متعددی نشان داده است که SOS1، SOS2 و SOS3 در یک مسیر عمومی در کنترل تنش شوری عمل می‌کنند. Que et al. (2002) and Rivandi et al. (2010) بیان کردند که کینازهای SOS2 و SOS3 با یکدیگر اثر متقابل داشته و به‌صورت مستقیم و پشت سر هم فسفریله می‌شوند. فعال شدن SOS2 در اثر فسفریلاسیون ترانسپورتر SOS1 را فعال می‌کند، این ژن فعال کننده آنتی‌پورتر Na^+/H^+ روی غشای واکوئلی برای ورود یون

[1] Biological process
[2] Molecular functions
[3] Cellular components

[4] Salt overlay signaling
[5] Calcium binding proteins

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.3.9]

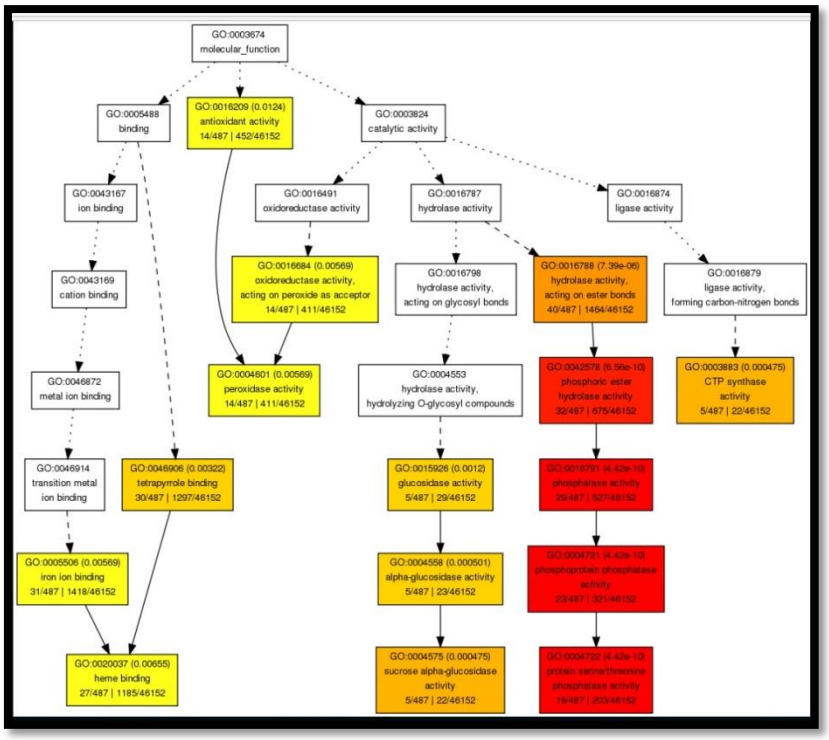
سدیم به درون واکوئل و نیز مسئول خروج یون سدیم از طریق غشای پلاسمایی است. گروه ژنی دیگری که به شدت تحت تاثیر تنش شوری قرار گرفتند، مربوط به گروه آنتی اکسیدان‌ها (GO:0016209) بود. تنش شوری مانند دیگر تنش‌های محیطی باعث تجمع گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS) مانند سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل در سلول و آسیب رساندن به لیپیدهای غشا، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود. آنزیم‌های آنتی اکسیدان مهم‌ترین ترکیبات در سیستم‌های جاروب‌گر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) هستند و نخستین راه مقابله با تنش‌های اکسیداتیو می‌باشند. در گیاهان عالی سیستم جاروب‌گر گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS) از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر کاتالاز (CAT)، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، پلی فنول اکسیداز (PPO) و آسکوربات پراکسیداز (APX) تشکیل شده‌اند، که می‌توانند گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در شرایط تنش را از بین ببرند. آنزیم‌های آنتی اکسیدان از غشاها در مقابل اثرات مخرب ROS که در برابر تنش‌های غیرزنده تولید می‌شوند، محافظت نموده و موجب مقاومت و پایداری گیاهان در برابر تنش شوری می‌شوند. کاتالاز آنزیمی است که به‌طور مستقیم باعث تجزیه پراکسید هیدروژن می‌شود (Notondo et al. 2004; Pan et al. 2006). نتایج آزمون معنی‌داری تعدادی از GOهای معنی‌دار در جدول شماره ۱ آورده شده‌است.

در مجموع در این تحقیق مشاهده شد که وقتی گیاه جو با تنش شوری مواجه می‌شود مکانیسم‌های مختلفی در آن فعال می‌شوند که طی آن ژن‌های متعدد با عملکردهای متفاوت سعی در برقراری تعادل در متابولیسم سلولی جهت بقا گیاه می‌کنند، که با به‌کارگیری نرم‌افزارهای دارای الگوریتم‌های کامپیوتری قدرتمند شناسایی و مدل‌سازی شبکه تنظیمی بیان ژن در پاسخ به تنش‌ها امکان‌پذیر می‌باشد.

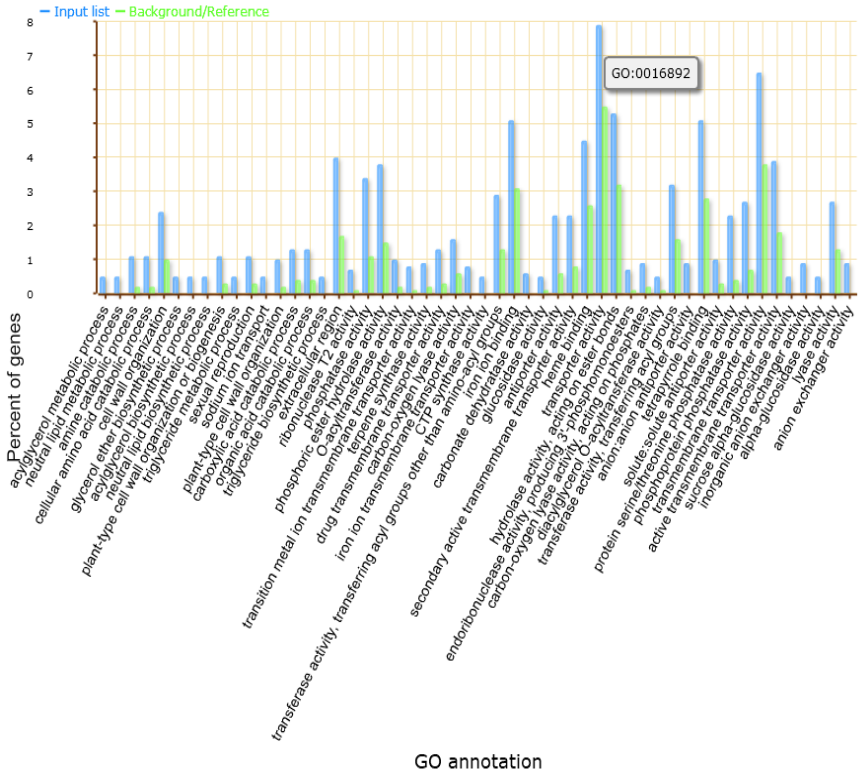
جدول ۱- نتاج تعدادی از تجزیههای Gene Ontology با وب‌سایت AgriGO در سطح معنی‌داری FDR<0.05.

GO term	Ontology	Description	p-value	FDR
GO:0004722	F	protein serine/threonine phosphatase activity	1/70E-09	0.0000013
GO:0015380	F	Anion exchanger activity	1/10E-08	0.0000021
GO:0005452	F	inorganic anion exchanger activity	1/10E-08	0.0000021
GO:0015301	F	anion:anion antiporter activity	1/10E-08	0.0000021
GO:0004721	F	phosphoprotein phosphatase activity	1/60E-08	0.0000026
GO:0005381	F	iron ion transmembrane transporter activity	2/30E-08	0.000003
GO:0016791	F	phosphatase activity	7/30E-08	0.0000083
GO:0015297	F	antiporter activity	1/80E-07	0.000017
GO:0042578	F	phosphoric ester hydrolase activity	7/50E-07	0.000066
GO:0022857	F	transmembrane transporter activity	6/70E-05	0.0031
GO:0046906	F	tetrapyrrole binding	7/90E-05	0.0035
GO:0008374	F	O-acyltransferase activity	0/00013	0.0052
GO:0015238	F	drug transmembrane transporter activity	0/00015	0.0058
GO:0003883	F	CTP synthase activity	0/00019	0.0066
GO:0010333	F	terpene synthase activity	0/00018	0.0066
GO:0004575	F	sucrose alpha-glucosidase activity	0/00019	0.0066
GO:0004558	F	alpha-glucosidase activity	0/00023	0.0073
GO:0019432	P	triglyceride biosynthetic process	1/20E-05	0.0081
GO:0006641	P	triglyceride metabolic process	1/70E-05	0.0081
GO:0009063	P	cellular amino acid catabolic process	1/50E-05	0.0081
GO:0016838	F	carbon-oxygen lyase activity	0/0004	0.011
GO:0046504	P	glycerol ether biosynthetic process	6/80E-05	0.012
GO:0006639	P	acylglycerol metabolic process	8/50E-05	0.012
GO:0020037	F	heme binding	0/00048	0.013
GO:0005506	F	iron ion binding	0/00057	0.014
GO:0009664	P	plant-type cell wall organization	0/00013	0.015
GO:0006814	P	sodium ion transport	0/00013	0.015
GO:0005215	F	transporter activity	0/0011	0.026
GO:0004144	F	diacylglycerol O-acyltransferase activity	0/0021	0.047

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.3.9]



شکل ۲- بخشی از pathway ترسیم شده در رابطه با تجزیه Gene Ontology با استفاده از وب‌سایت AgriGO در سطح معنی‌داری FDR<0.05.



شکل ۳- نمودار میله‌ای مربوط به بخش Molecular Functions با استفاده از وب‌سایت AgriGO در سطح معنی‌داری FDR<0.05. که در آن درصد ژن‌های مشارکت کنند در هر یک از گروه‌های GO بر روی محور عمودی و عملکردهای بیولوژیکی هر یک از آن‌ها بر روی محور افقی نمایش داده شده‌است.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.3.9]

منابع

Ahmed IM, Nadira UA, Bibi N, Cao F, He X, Zhang G, Wu F (2015) Secondary metabolism and antioxidants are involved in the tolerance to drought and salinity, separately and combined, in Tibetan wild barley. Environmental and Experimental Botany 31: 111:1-2.

Ali S, Charles TC, Glick BR (2014) Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. Plant Physiology and Biochemistry 31:80:160-7.

Bahieldin A, Atef A, Sabir JS, Gadalla NO, Edris S, Alzohairy AM, Radhwan NA, Baeshen MN, Ramadan AM, Eissa HF, Hassan SM (2015) RNA-Seq analysis of the wild barley (*H. spontaneum*) leaf transcriptome under salt stress. Comptes rendus biologies 338:285-97.

Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30:2114-20.

Castillo EG, Tuong TP, Ismail AM, Inubushi K (2007) Response to salinity in rice: Comparative effects of osmotic and ionic stresses. Plant Production Science 10:159-70.

Chen Z, Pottosin II, Cuin TA, Fuglsang AT, Tester M, Jha D, Zepeda-Jazo I, Zhou M, Palmgren MG, Newman IA, Shabala S (2007) Root plasma membrane transporters controlling K+/Na+ homeostasis in salt-stressed barley. Plant Physiology 145:1714-25.

Forster BP, Ellis RP, Thomas WT, Newton AC, Tuberosa R, This D, El-Enein RA, Bahri MH, Ben Salem M (2000) The development and application of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley. Journal of Experimental Botany 51:19-27.

Gao R, Duan K, Guo G, Du Z, Chen Z, Li L, He T, Lu R, Huang J (2013) Comparative transcriptional profiling of two contrasting barley genotypes under salinity stress during the seedling stage. International Journal of Genomics 19:2013.

Girke T (2015) systemPipeR: NGS workflow and report generation environment. University of California-Riverside, Riverside, CA. 24.

Golldack D, Li C, Mohan H, Probst N (2014) Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. Frontiers in Plant Science 5.

Gozukirmizi N, Karlik E (2017) Barley (Hordeum vulgare L.) Improvement Past, Present and Future. InBrewing Technology. InTech.

Hald PM (1947) The flame photometer for the measurement of sodium and potassium in biological materials. Journal of Biological Chemistry 167:499-510.

Hauser F, Horie T (2010) A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K+/Na+ ratio in leaves during salinity stress. Plant, Cell and Environment 33:552-65.

Hauser F, Horie T (2010) A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K+/Na+ ratio in leaves during salinity stress. Plant, Cell and Environment 33:552-65.

Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. Genome Biology 14:R36.

Mahajan S, Pandey GK, Tuteja N (2008) Calcium-and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. Archives of Biochemistry and Biophysics 471:146-58.

Mardis ER (2008) The impact of next-generation sequencing technology on genetics. Trends in Genetics 24:133-41.

Parihar P, Singh S, Singh R, Singh VP, Prasad SM (2015) Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. Environmental Science and Pollution Research 22:4056-75.

Peng Z, Wang M, Li F, Lv H, Li C, Xia G (2009) A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat. Molecular and Cellular Proteomics 8:2676-86.

Qiu QS, Guo Y, Dietrich MA, Schumaker KS, Zhu JK (2002) Regulation of SOS1, a plasma membrane Na+/H+ exchanger in Arabidopsis thaliana, by SOS2 and SOS3. Proceedings of the National Academy of Sciences 99:8436-41.

Qiu QS, Guo Y, Quintero FJ, Pardo JM, Schumaker KS, Zhu JK (2004) Regulation of vacuolar Na+/H+ exchange in Arabidopsis thaliana by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. Journal of Biological Chemistry.279:207-15.

Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010) edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics. 26:139-40.

Roy SJ, Negrão S, Tester M (2014) Salt resistant crop plants. Current Opinion in Biotechnology 26:115-24.

Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Hückelhoven R, Neumann C, von Wettstein D, Franken P (2005) The endophytic fungus Piriformospora indica reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102:13386-91.

Willenbrock H, Salomon J, Søkilde R, Barken KB, Hansen TN, Nielsen FC, Møller S, Litman T (2009) Quantitative miRNA expression analysis: comparing microarrays with next-generation sequencing. Rna 15:2028-34.

Yamaguchi T, Blumwald E (2005) Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. Trends in Plant Science 10:615-20.

Zhu JK (2001) Cell signaling under salt, water and cold stresses. Current Opinion in Plant Biology 4:401-6.

País SM, Téllez-Iñón MT, Capiati DA (2009) Serine/threonine protein phosphatases type 2A and their roles in stress signaling. Plant Signaling and Behavior 4:1013-5.

Cui MH, Yoo KS, Hyoung S, Nguyen HT, Kim YY, Kim HJ, Ok SH, Yoo SD, Shin JS (2013) An Arabidopsis R2R3-MYB transcription factor, AtMYB20, negatively regulates type 2C serine/threonine protein phosphatases to enhance salt tolerance. FEBS letters 587:1773-8.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.3.9]

Pan Y, Wu LJ, Yu ZL (2006) Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (Glycyrrhiza uralensis Fisch). Plant Growth Regulation 49:157-65.
Netondo GW, Onyango JC, Beck E (2004) Sorghum and salinity: I. Response of growth, water relations, and ion accumulation to NaCl salinity. Crop Science 44:797.
Nirmala J, Brueggeman R, Maier C, Clay C, Rostoks N, Kannangara CG, von Wettstein D, Steffenson BJ, Kleinhofs A (2006) Subcellular localization and functions of the barley stem rust resistance receptor-like serine/threonine-specific protein kinase Rpg1. Proceedings of the National Academy of Sciences 103:7518-23
Rivandi J, Miyazaki J, Hrmova M, Pallotta M, Tester M, Collins NC (2010) A SOS3 homologue maps to HvNax4, a barley locus controlling an environmentally sensitive Na+ exclusion trait. Journal of Experimental Botany 62:1201-16.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.3.9]