

داده کاوی پروفایل ترانسکریپتومی کتان تحت تنش سمیت آلومینیوم و کمبود روی

Data mining of flax transcriptome profile under stress aluminum toxicity and zinc deficiency

زهرا دانایی پور^۱، قاسمعلی گروسی^۱، مسعود توحیدفر^{۲*}، محمدرضا بختیاریزاده^۳، محمد حسین میرجلیلی^۴

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه

بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین

۲- استاد تمام، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی،

تهران

۳- استادیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۴- دانشیار، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

Danaeipour Z¹, Garoosi Gh¹, Tohidfar M^{*2}, Bakhtiarizadeh MR³, Mirjalili MH⁴

1- PhD Student, Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

2- Professor, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Animal and Poultry Science, College of Aburrihan, University of Tehran, Tehran, Iran

4- Associate Professor, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m_tohidfar@sbu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۰۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۰۵)

چکیده

گیاه کتان (*Linum usitatissimum* L.) در سراسر جهان به دلیل کاربرد گسترده در صنایع غذایی، نساجی و دارویی در مقیاس وسیع کشت می شود. یکی از عواملی که کشت و کار این گیاه را تحت تاثیر قرار می دهد تنش های غیر زیستی از جمله pH نامناسب و خاک دارای کمبود یا سمیت عناصر غذایی است که منجر به کاهش کمیت و کیفیت آن می شود. بنابراین شناسایی ژن های پاسخگو به تنش های مختلف ضروری است. در مطالعه حاضر، با استفاده از داده های RNA-Seq به دست آمده از ریشه گیاه کتان تحت تنش سمیت آلومینیوم و کمبود روی به بررسی DEG ها به منظور شناسایی تغییرات پاسخگو به تنش در دو کلتیوار مقاوم و حساس پرداخته شد. در مجموع ۳۰ تا DEG مشترک بین کلتیوارهای مقاوم و ۹۷ تا DEG مشترک بین کلتیوارهای حساس در هر دو تنش شناسایی شد که در آن تعداد DEG ها در رقم حساس بیشتر بوده و چهار ژن مشترک بین حساس و مقاوم بود. بیشترین تغییرات کلی DEG های مشترک مربوط به فرآیندهای زیستی اختصاصی کتان، فرآیندهای متابولیکی و فرآیندهای سلولی بود که نشان دهنده وضعیت فعال متابولیکی سلول گیاهی است. کلتیوارهای مقاوم به طور اختصاصی تر پاسخ داده و بیشتر ژن ها در GO مرتبط پاسخ به محرک ها قرار گرفتند. در شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین کلتیوارهای حساس، کیتینازها و ژن PR4 بیشترین ارتباط را با سایر پروتئین ها داشتند، در حالی که در کلتیوارهای مقاوم استراتژی مقاومت متفاوت بود و بیان ژن های تغییر دهنده دیواره سلولی بیشترین ارتباط را با سایر پروتئین ها نشان دادند. به طور کلی پروفایل بیانی ژن های پاسخگو به تنش نشان داد که در هر دو کلتیوار ژن PR1 بیشترین تغییرات را داشت و می توان به عنوان مارکر مقاومت برای اهداف به نژاد گیاهی استفاده نمود. همچنین بیوسنتز متابولیت های ثانویه که به نوعی پاسخ به تنش است به طور معنی داری افزایش یافت. نتایج به دست آمده بیش های جدیدی در مورد مکانیسم تحمل به تنش های غیر زیستی کتان ارائه می دهد که می توان جهت بهبود عملکرد کمی و کیفی گیاهان مورد استفاده قرار داد.

واژه های کلیدی

سمیت آلومینیوم

کمبود روی

هستی شناسی ژن

Linum usitatissimum L
RNA-Seq

مقدمه

گیاهان به دلیل عدم تحرک به طور مداوم در معرض طیف وسیعی از شرایط تنش قرار می گیرند که باعث کاهش عملکرد آن ها می شود. تنش های غیرزیستی اصلی شامل خشکی، شوری، گرما، سرما، انجماد، شدت نور بالا و عدم تعادل عناصر غذایی است و به صورت گسترده مورد مطالعه قرار گرفته اند (Cohen and Leach 2019) اما گیاه در اکوسیستم طبیعی خود با ترکیبی از دو یا چند تنش مواجه می شود. برای مثال آن ها تحت شرایط طبیعی ممکن است در معرض تنش خشکی و شوری، خشکی و گرما، گرما و شدت نور بالا و یا تغییر pH و عدم تعادل مواد مغذی قرار گیرند. امروزه پدیده گرم شدن کره زمین همراه با تغییرات شدید آب و هوایی احتمال بروز تنش های چندگانه را در زمین های زراعی افزایش می دهد (Suzuki et al. 2014). تعداد زیادی از این تنش ها pH خاک را تغییر می دهند که به صورت مستقیم و غیرمستقیم تاثیر زیادی بر فرآیندهای بیوشیمیایی خاک دارد به طوری که می توان آن را به عنوان متغیر اصلی خاک توصیف کرد. pH خاک به طور مستقیم ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC) را تغییر می دهد (Neina 2019). وجود بارهای منفی روی کلئیدهای خاک باعث ایجاد CEC خاک می شود و CEC خاک به دلیل تغییر بار منفی به طور قابل توجهی در نوسان است (Gondal et al. 2021). زمانی که pH خاک بر اساس شرایط آب و هوایی به ویژه باران های اسیدی در طول زمان و نوع سنگ مادری اسیدی می شود، در بخش قابل توجهی از ظرفیت تبادل کاتیونی آن، آلومینیوم و هیدروژن به جای یون های بازی کلسیم، منیزیم، پتاسیم و سدیم قرار می گیرد. آلومینیوم و هیدروژن جایگزین یون ها در محل های تبدلی شده و این یون ها به اعماق پروفیل خاک شسته می شوند (Khadem et al. 2015). در این شرایط فرم محلول Al^{3+} قادر به عبور از غشای گیاه است، رشد را محدود می کند و برای گیاهان بسیار سمی است. تجمع Al ابتدا در راس ریشه صورت می گیرد به طوری که غلظت های بسیار کم آن نیز می تواند رشد ریشه را در عرض چند دقیقه یا چند ساعت در بسیاری از گونه های گیاهی مهار کند (Eekhout et al. 2017; Shavrukov and Hirai 2016). از آثار سمیت Al در اندام هوایی می توان به تغییرات فیزیولوژیکی از قبیل کاهش منافذ روزنه ای و کاهش فعالیت فتوسنتزی اشاره نمود که سبب کلروزه و نکروزه

شدن برگ ها می شود. در سطح سلولی، Al بر طولیل شدن و تقسیم سلولی، جذب و انتقال مواد مغذی و هموستاز کلسیم تاثیر منفی می گذارد و ساختار و عملکرد غشای پلازما، دیواره سلولی و کروماتین را مختل می کند. در طی تکامل دو مکانیسم اصلی مقاومت در برابر سمیت آلومینیوم در گیاهان ایجاد شده است (Ramzi et al. 2018). در مکانیسم حذف خارجی، گیاهان با ترشح و کلاته کردن اسیدهای آلی یا فنل ها در ریشه ها، تغییر ویژگی های دیواره سلولی و قلیایی شدن ریزوسفر، مقدار سمیت Al^{3+} در سلول ها را کاهش می دهند که منجر به تحمل درونی و سپس کاهش سمیت Al را در سمپلاست ریشه و اندام هوایی می شود (Yan et al. 2022). در این مکانیسم ژن های کدکننده ناقل های اسیدهای آلی (OA)، از جمله ناقل ملات فعال شده با آلومینیوم (ALMT1) و اعضای خانواده ژنی ناقل سترات اکستروژن چند دارویی و ترکیبات سمی (MATE) درگیر هستند (Liu et al. 2009). مکانیسم دیگر سم زدایی داخلی است که شامل سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی، توزیع مجدد Al^{3+} مانند بخش بندی واکوئلی و پاسخ اکسین است (Yan et al. 2022).

زمانی که pH خاک بر اثر تجمع نمک افزایش می یابد، روی در خاک به اشکال مختلف $ZnCO_3$ و $Zn(OH)_2$ رسوب می کند که منجر به کاهش حلالیت آن در خاک می شود (Sadeghzadeh et al. 2021). بنابراین میزان عنصر روی در دسترس گیاه کاهش می یابد. با توجه به نوع گیاه و حتی ژنوتیپ میزان جذب روی از خاک متفاوت است. گیاهان بر اساس ماده ای که از ریشه ترشح می کنند، دو استراتژی فیزیولوژیکی در جذب روی دارند: استراتژی اول شامل جریان احیاکننده ها، اسیدهای آلی و یون های H^+ ، که حلالیت روی را برای جذب توسط سلول های اپیدرمی ریشه افزایش می دهد، و دیگری شامل خروج فیتوسیدروفورها و ایجاد کمپلکس های پایدار با Zn^{2+} است (Wang et al. 2019). سپس به بافت های دیگر مانند آوند چوبی، برگ ها و دانه ها منتقل می شود. در طی این فرآیند، پروتئین های متعددی دخیل هستند که به گیاه اجازه می دهند نه تنها روی را جذب و توزیع کند، بلکه روی اضافی را از طریق واکوئل ها حذف و هموستازی روی را تقویت کند (Sinclair and Krämer 2012). در مطالعه ای در گیاه گندم تحت تنش کمبود روی گزارش شد که بیان هماهنگ ژن های کدکننده خانواده ZIP در بافت ها برای

به تحمل آلومینیوم می‌شوند (Krasnov et al. 2019). نقش UDP-گلیکوزیل ترانسفرازها، گلوکاتایون S-ترانسفرازها و $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ changer CAX3 در تحمل کتان به آلومینیوم اثبات شده است (Dmitriev et al. 2016; Zyablitsin et al. 2018). *miR390* و *miR393* نیز از طریق تنظیم فرآیندهای رشد در پاسخ آلومینیوم شرکت می‌کنند (Dmitriev et al. 2017). در مطالعه‌ای دیگر پروفایل ترانسکریپتوم کتان در واکنش به افزایش سطح pH و کمبود روی در دو رقم کتان با تحمل متفاوت بررسی شد. ژن‌هایی با تغییرات بیانی شناسایی شده که در فرآیندهای متنوعی از جمله انتقال یون، زیست‌زایی دیواره سلولی و فتوسنتز نقش داشتند. علاوه بر این، ژن‌هایی با تغییرات بیان معنی‌دار بین ژنوتیپ‌های متحمل و حساس کشف شد (Dmitriev et al. 2019). با این حال شناخت مکانیسم‌های پاسخ کتان به تنش‌ها و شناسایی نامزدهای ژن مقاومت نیاز به مطالعه بیشتری دارد. در مطالعه حاضر، با استفاده از داده‌های RNA-Seq به‌دست آمده از ریشه گیاه کتان تحت تنش pH نامناسب، کمبود روی و سمیت آلومینیوم به بررسی ژن‌های با بیان متفاوت به‌منظور شناسایی تغییرات پاسخگو به تنش پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از داده‌های RNA-Seq مربوط به ۱۲ نمونه از ریشه کتان زراعی تحت تیمار کمبود روی با طول خوانش ۷۹ نوکلئوتید و میانگین مقدار ۱/۴ گیگا باز برای هر نمونه و ۱۶ نمونه تحت سمیت آلومینیوم با طول خوانش ۲۰۲ نوکلئوتید و میانگین مقدار ۴ گیگا باز برای هر نمونه استفاده شد (جدول ۱).

اطمینان از افزایش جذب روی و انتقال ریشه به ساقه ضروری است (Gong et al. 2022). عنصر روی یکی از اجزاء ساختاری بسیاری از فاکتورهای رونویسی است و تنها یون فلزی می‌باشد که در تمام شش کلاس آنزیمی حضور دارد لذا کمبود آن منجر به اختلال در فعالیت آنزیم‌ها، مهار فتوسنتز، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و افزایش تجمع آهن و در نهایت کاهش عملکرد می‌شود (Gupta et al. 2016).

گیاه کتان (*Linum usitatissimum* L.) از خانواده Linaceae یکی از گیاهان صنعتی مهم در سراسر جهان است که کاربرد گسترده‌ای در صنایع غذایی، نساجی و دارویی دارد. این گیاه در نواحی زیادی از جهان با خاک‌هایی با ویژگی‌های مختلف در مقیاس وسیع کشت می‌شود (Jhala and Hall 2010). محیط‌های نامساعد مانند pH نامناسب خاک دارای کمبود یا سمیت عناصر غذایی منجر به کاهش کمیت و کیفیت کتان می‌شود (Rozhmina et al. 2017). بنابراین ضروری است که برای بهبود کلتیوارها، ژن‌های پاسخگو به تنش‌های چندگانه شناسایی شوند. توالی‌یابی با توان بالا برای مطالعه پاسخ کتان به تنش‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است اما در بیشتر مطالعات پاسخ به یک نوع تنش بررسی شده و مطالعات کمی در مورد تنش‌های چندگانه به‌ویژه در راستای بررسی میزان تحمل ژنوتیپ مورد نظر به تنش در دسترس است (Dmitriev et al. 2019). برای مثال، تغییرات بیان ژن در چهار ژنوتیپ کتان با تحمل متفاوت در مواجهه با تنش کوتاه مدت سمیت آلومینیوم با استفاده از توالی‌یابی RNA-Seq بررسی شد. نتایج نشان داد که فاکتورهای رونویسی NAC همراه با MADS-box، رشد و نمو گیاه را تنظیم می‌کنند و با دخالت در تغییر دیواره سلولی منجر

جدول ۱- اطلاعات مربوط به کلتیوارهای مقاوم و حساس تحت تنش سمیت آلومینیوم و کمبود روی و نتایج حاصل از هم‌ردیفی با ژنوم کتان زراعی

نوع تنش	نام نمونه‌ها	کلتیوار	بافت نمونه	تعداد کل خوانش‌های خام	تعداد کل خوانش‌ها بعد از کنترل کیفی	میانگین هم‌ردیفی با ژنوم (درصد)
کمبود روی PRJNA497472	کلتیوار مقاوم (pH=۷/۵)	Norlin	ریشه	۲۲۰۱۰۷۶۰۱	۲۱۹۷۲۴۶۸۵	۹۴/۹۶
	کلتیوار حساس (pH=۵/۵)	Mogilevsky	ریشه	۲۱۴۴۹۵۷۴۶	۲۱۴۱۷۲۹۹۴	۹۴/۶۹
سمیت آلومینیوم PRJNA343117	کلتیوار مقاوم (pH=۴/۵)	Hermes	ریشه	۱۰۸۹۱۳۹۵۲	۱۰۷۲۸۶۷۷۶	۹۳/۰۷
		TMP1919		۱۱۱۲۸۳۸۵۸	۱۰۷۰۱۵۷۷۰	۹۱/۶۵
	کلتیوار حساس (pH=۴/۵)	Orshanskiy	ریشه	۱۱۱۳۵۳۵۴۰	۱۱۰۰۵۳۴۹۴	۹۳/۷۶
		Lira	ریشه	۱۰۹۲۸۴۷۴۱	۱۰۷۶۴۷۶۳۲	۹۲/۱۳

که با روش FDR تصحیح شده بودند به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

شبکه ژنی

برای بررسی برهم کنش های پروتئین- پروتئین، ژن های مشترک به پایگاه String ارائه شدند. سپس برای شناسایی ژن های هاب (پنج گره با بیشترین برهمکنش) از نرم افزار Cytoscape گزینه Cytohubba براساس الگوریتم محاسباتی MNC استفاده شد (Smoot et al. 2011).

نتایج

از تمام سمل ها تعداد ۸۷۵۴۳۹۴۳۸ خوانش خام به دست آمد که بین ۲۲/۴۵ تا ۴۱/۷ میلیون متغیر بود. در فرآیند پیرایش اگر کیفیت نوکلئوتید یا خوانشی کمتر از ۳۰ بود یا آلودگی آداپتوری داشت، آن خوانش حذف شد. برای داده های مورد استفاده به طور میانگین کمتر از یک درصد آن ها در طی فرآیند پیرایش حذف شد که نشان دهنده کیفیت بسیار مناسب داده ها بود. تعداد کل خوانش های با کیفیت ($Q > 30$) پس از ویرایش برای کلتیوارهای Norlin، Mogilevsky، Hermes، TMP1919، Orshanskiy و Lira به ترتیب ۲۱۹۷۲۴۶۸۵، ۲۱۴۱۷۲۹۹۴، ۱۰۷۲۸۶۷۷۶، ۱۰۷۰۱۵۷۷۰، ۱۱۰۰۵۳۴۹۴ و ۱۰۷۶۴۷۶۳۲ برآورد شد. بیشترین تعداد کل خوانش ها برای کلتیوار Norlin تحت تیمار کمبود روی و کمترین تعداد کل خوانش ها برای کلتیوار TMP1919 تحت تیمار سمیت آلومینیوم بود. خوانش ها با میانگین ۹۳/۴ درصد با ژنوم مرجع کتان به طور اختصاصی هم ردیف شدند (جدول ۱).

ارزیابی ژن های با بیان متفاوت

جهت شناسایی ژن هایی که به طور معنی دار در کلتیوارهای مقاوم و حساس کتان نسبت به کنترل میزان بیان آن ها تغییر کرده است، آنالیز تفاوت بیان ژن به صورت جداگانه در هر آزمایش بررسی شد. نتایج نشان داد که تعداد کل ژن های با بیان متفاوت (DEGs) بین ۲۱ تا ۳۵۲۶ متغیر بود که به نوع کلتیوار و نوع تیمار مورد استفاده وابسته بود. بیشترین تعداد DEG ها برای کلتیوار حساس Mogilevsky تحت تنش کمبود روی و کمترین DEG ها متعلق به کلتیوار مقاوم TMP1919 تحت تنش سمیت آلومینیوم مشاهده شد. تعداد

نمونه های تحت کمبود روی شامل کلتیوار حساس Mogilevsky و کلتیوار مقاوم Norlin و نمونه های تحت سمیت آلومینیوم شامل دو کلتیوار حساس Orshanskiy و Lira و دو کلتیوار مقاوم Hermes و TMP1919 بودند. داده های مربوطه از بانک اطلاعاتی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI)، بخش GEO دریافت شد. کیفیت خوانش ها با استفاده از نرم افزار FASTQC کنترل شد. خوانش های دارای آلودگی های آداپتوری و خوانش های با کیفیت کمتر از ۳۰ توسط Trimmomatic ویرایش شدند (Bolger et al. 2014). سپس هم ردیفی خوانش ها با ژنوم مرجع *L. usitatissimum* و فایل هایی حاشیه نویسی شده GTF ([https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=](https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Lusitatissimum)) با استفاده از HISAT ورژن 2.2.1 و HTSeq-count ورژن 0.12.4 صورت گرفت (Anders et al. 2015; Perte et al. 2016).

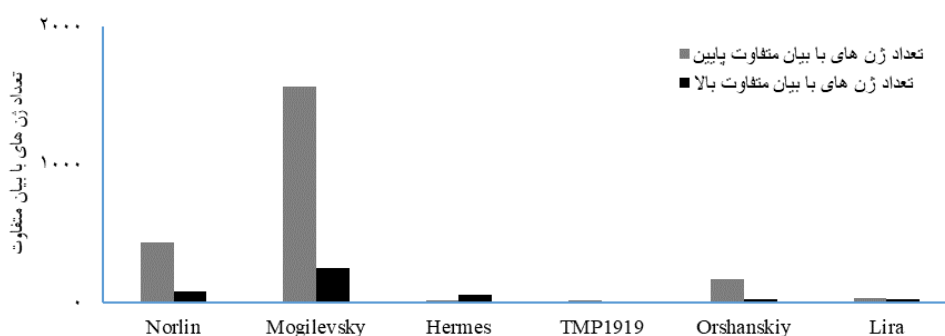
به این منظور ماتریس بیان ژن هر کلتیوار در مقایسه با نمونه کنترل از همان کلتیوار مورد بررسی قرار گرفت. شناسایی ژن های با بیان متفاوت با استفاده از بسته DESeq2 نرم افزار R بر اساس مدلی مبتنی بر توزیع دوجمله ای منفی انجام شد. در این آنالیز ژن های با مقادیر $P < 0.05$ که با روش FDR تصحیح شده بودند جداسازی شد (Love et al. 2014).

پس از شناسایی ژن های با بیان متفاوت، بهترین شناسه های متناظر TAIR با استفاده از حاشیه نویسی از پایگاه داده کتان به دست آمد. سپس، نمودار Venn برای شناسایی شناسه های مشترک TAIR متناظر با ژن های با بیان متفاوت در کلتیوارهای مقاوم و حساس تحت هر دو تنش با استفاده از Venny ورژن 2.1.0 رسم شد. ژن های مشترک با بیان متفاوت حاصل برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

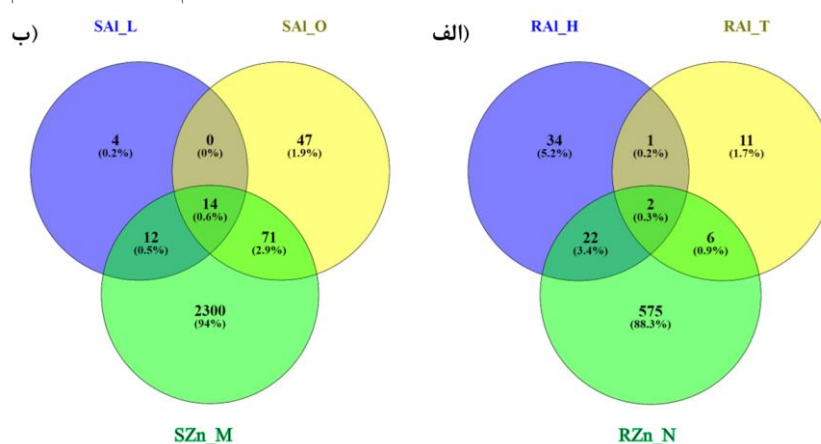
به منظور بررسی GO و تعیین ویژگی های عملکردی ژن های مشترک با بیان متفاوت معنی دار در کلتیوارهای مقاوم و حساس از AgriGO و David استفاده شد (Du et al. 2010). GO های شناسایی شده در سه گروه عملکردهای مولکولی، فرآیندهای بیولوژیکی و اجزای سلولی قرار گرفتند. سپس برای فرآیندهای بیولوژیکی مشترک نمودار ستونی رسم شد. مستندسازی مسیرهای مشترک نیز با استفاده از پایگاه KEGG به دست آمد و مسیرهای با مقادیر $P < 0.05$

۲/۷۷ برابر برای ژن *CYP76C4* و کاهش بیان با مقدار ۳/۲۳- برابر برای ژن *AT2G47710* مشاهده شد (جدول ۲). در حالی که تعداد ژن‌های مشترک بین دو کلتیوار حساس به آلومینیوم و یک کلتیوار حساس به کمبود روی بیشتر بود. به طوری که که از ۹۷ ژن مشترک، ۸۵ ژن بین کلتیوار *Mogilevsky* با کلتیوار *Orshanskiy* و ۲۶ ژن با کلتیوار *Lira* برآورد شد. بین هر سه کلتیوار حساس ۱۴ ژن مشترک به طور معنی دار تفاوت بیان نشان دادند و سایر ژن‌ها به طور اختصاصی به تنش پاسخ دادند (شکل ۲، ب). در بین ژن‌های مشترک کلتیوارهای حساس اکثر ژن‌ها بیان منفی نشان دادند، بیش‌ترین افزایش بیان با مقدار ۲/۳۳ برای ژن *AT5G10130* و کاهش بیان با مقدار ۲۱/۴۷- برای ژن *AT1G52820* مشاهده شد (جدول ۳).

DEG‌های با بیان پایین در تمام کلتیوارها به جز *Hermes* بیشتر از تعداد DEG‌های با بیان بالا بود (شکل ۱). به منظور شناسایی هسته مشترک پاسخ به تنش سمیت آلومینیوم و کمبود روی، ارتولگ‌های DEG‌های کتان با آرکیدوپسیس همردیف شدند. سپس نمودار *Venn* بین کلتیوارهای حساس و مقاوم به صورت جداگانه رسم شد (شکل ۲). نتایج نشان داد که در مجموع بین دو کلتیوار مقاوم به آلومینیوم و یک کلتیوار مقاوم به کمبود روی ۳۰ ژن مشترک وجود دارد که کلتیوار *Norlin* در ۲۴ ژن با کلتیوار *Hermes* و در ۸ ژن با کلتیوار *TMP1919* مشترک است. بین هر سه این کلتیوارها فقط ۲ ژن کاملاً مشترک بودند و سایر ژن‌ها به طور اختصاصی به تنش پاسخ دادند (شکل ۲، الف). در بین ژن‌های مشترک کلتیوارهای مقاوم بیش‌ترین افزایش بیان با مقدار



شکل ۱- تعداد ژن‌های با تفاوت بیان معنی‌دار شناسایی شده تحت شرایط کمبود روی و سمیت آلومینیوم در کلتیوارهای مقاوم و حساس کتان زراعی



شکل ۲- نمودار ون دیاگرام الف) کلتیوارهای مقاوم؛ ب) کلتیوارهای حساس

SAL-L: کلتیوار حساس *Lira* سمیت آلومینیوم؛ SAL-O: کلتیوار حساس *Orshanskiy* سمیت آلومینیوم؛ SZn-M: کلتیوار حساس *Mogilevsky* کمبود روی؛ RAL-H: کلتیوار مقاوم *Hermes* سمیت آلومینیوم؛ RAL-T: کلتیوار مقاوم *TMP1919* سمیت آلومینیوم؛ RZn-N: کلتیوار مقاوم *Norlin* کمبود روی

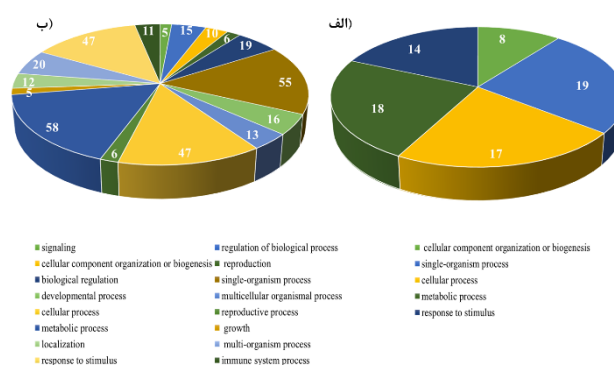
جدول ۳- لیست ژن‌هایی مشترک با بیشترین افزایش و کاهش بیان در کلتیوارهای حساس کتان زراعی تحت تنش کمبود روی و سمیت آلومینیوم

	نام ژن	عملکرد	Log2FoldChange	
			سمیت آلومینیوم	کمبود روی
Up	AT1G11340	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase RKS1	۲/۰۸	۰/۹
	AT5G10130	Protein DOWNSTREAM OF FLC	۲/۳۳	۰/۵
	LCR68	Defensin-like protein 1	۲	۱/۱۵
	AT3G08030	F17A17.37 protein	۱/۵۸	۲/۱۹
	HKT1	Sodium transporter HKT1	۱/۵۲	۱/۲۲
	AT5G60520	At5g60520	۱/۳۷	۰/۶۴
	XTH5	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase	۱/۲۴	۱/۰۱
	BGAL5	Beta-galactosidase 5	۱/۰۸	۰/۷
Down	AT1G52820	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-۲۱/۴۷	-۲/۱
	AT1G17860	Kunitz trypsin inhibitor 2	-۹/۴۷	-۲/۸۹
	AT4G35160	Acetylserotonin O-methyltransferase	-۸/۷۴	-۰/۵۷
	PA2	Peroxidase 53	-۷/۱۷	-۳/۷۳
	BGLU17	beta glucosidase 17	-۷/۱۶	-۲/۹۸
	BG1	Probable glucan endo-1,3-beta-glucosidase BG1	-۶/۵۳	-۷/۳۷
	EXLB1	Expansin-like protein	-۵/۰۳۵	-۴/۸۸
	ChiC	Class V chitinase	-۴/۶۶	-۶/۲۳
	SHT	Spermidine hydroxycinnamoyl transferase	-۳/۸۳	-۶/۷۱
	PR4	Hevein-like preproprotein	-۳/۲۵	-۶/۱۳

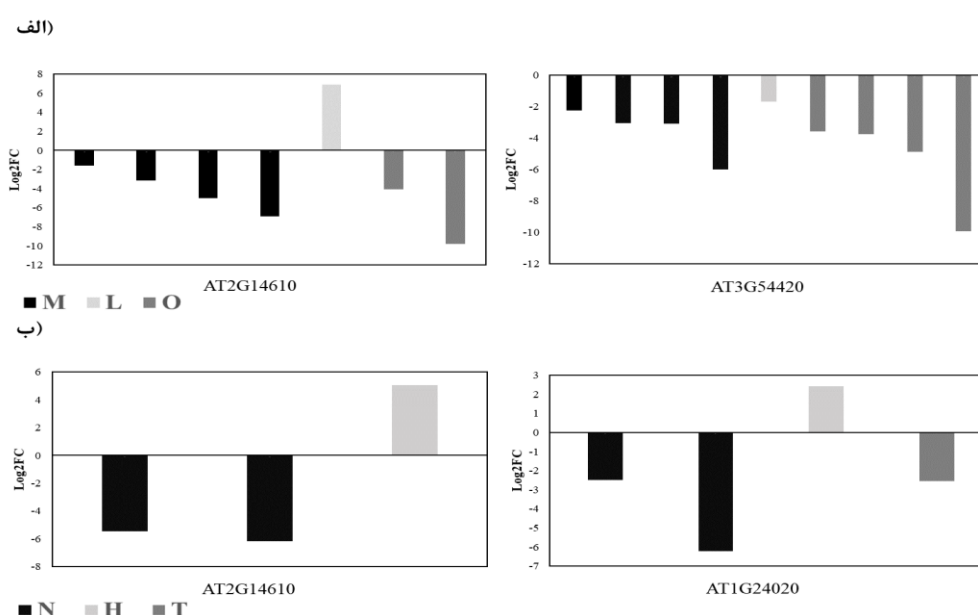
هستی‌شناسی ژن‌های مشترک

پس از یافتن ژن‌های مشترک، ارزیابی GO آن‌ها براساس فرآیندهای زیستی انجام شد. در طبقه‌بندی فرآیندهای زیستی، فرآیندهای زیستی اختصاصی کتان، فرآیندهای متابولیسمی و فرآیندهای سلولی دارای بیشترین ژن‌ها به ترتیب ۱۹، ۱۸ و ۱۷ در کلتیوار مقاوم و ۵۸، ۵۵ و ۵۷ در کلتیوار حساس بودند که نشان‌دهنده وضعیت فعال متابولیسمی سلول بود (شکل ۳). علاوه بر این، GO پاسخ به محرک‌ها در کلتیوارهای حساس به تنش با ۴۷ ژن و در کلتیوارهای مقاوم با ۱۴ ژن پس از GOهای فوق بالاترین مقدار را نشان داد که به دلیل واکنش گیاهان در پاسخ به محرک‌ها است. در کلتیوارهای حساس ژن‌ها در سایر GOها در گروه‌های مرتبط با سیگنالینگ، فرآیندهای نموی و تولیدمثل طبقه‌بندی شدند که حاکی از مکانیسم کاهش آسیب کلتیوارها در مواجهه با تنش و برنامه‌ریزی سلول به سمت فاز زایشی می‌باشد.

پاسخ به محرک‌ها در کلتیوارهای مقاوم شامل پاسخ به تنش‌ها، پاسخ‌های دفاعی، پاسخ به محرک‌های غیرزیستی و پاسخ به مواد شیمیایی بود. فعالیت پراکسیدازها در کلتیوارهای حساس کاهش یافت درحالی‌که در کلتیوارهای مقاوم افزایش یافت. در GO پاسخ به محرک‌ها بین سه کلتیوار مقاوم، ژن AT2G14610 بیشترین تغییر بیان را نسبت به کنترل نشان داد (شکل ۴). این ژن یک نوع PR1 است که در پاسخ به محرک‌ها به‌ویژه عوامل بیماری‌زا دخالت دارد. بیان ژن PR1 در کلتیوار مقاوم Hermes تحت سمیت آلومینیوم، ۵ برابر افزایش یافت در حالی‌که میزان بیان آن در کلتیوار مقاوم Norlin تحت تنش کمبود روی به میزان ۵/۸ برابر کاهش یافت (شکل ۴، ب).



شکل ۳- هستی‌شناسی فرآیندهای بیولوژیکی ژن‌های همپوشان کتان زراعی تحت تنش کمبود روی و سمیت آلومینیوم. (الف) هستی‌شناسی ژن‌های مشترک بین کلتیوارهای مقاوم، (ب) هستی‌شناسی ژن‌های مشترک بین کلتیوارهای حساس.



شکل ۴- نمودار بیشینه و کمینه تغییرات بیان مرتبط با ژن‌های قرار گرفته در طبقه GO پاسخگو به محرک‌ها: (الف) کلتیوارهای حساس، (ب) کلتیوارهای مقاوم. L: کلتیوار حساس Lira؛ O: کلتیوار حساس Orshanskiy؛ M: کلتیوار حساس Mogilevsky؛ H: کلتیوار Hermes؛ T: کلتیوار TMP1919؛ N: کلتیوار Norlin.

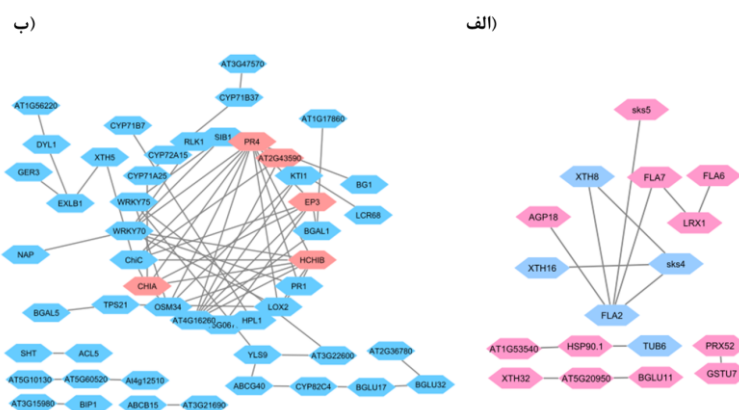
بیان در کلتیوار مقاوم در ژن AT1G24020 با مقدار ۶/۲- برای Norlin تحت تنش کمبود روی به‌دست آمد (شکل ۴، ب). این ژن تحت تنش سمیت آلومینیوم رفتار متفاوتی را در دو کلتیوار مقاوم نشان داد به‌طوری که در کلتیوار TMP1919 همسو با کلتیوار Norlin مقدار بیان کاهش یافت اما در کلتیوار Hermes مقدار بیان آن افزایش معنی‌داری داشت. AT1G24020 با نام دیگر MLP-like protein 423، در پاسخ دفاعی و مسیر سیگنالینگ فعال شده توسط اسید آبسزیک درگیر می‌باشد.

به‌منظور فهم بهتر برهمکنش‌های بین پروتئین‌های متناظر با ژن‌های هسته مشترک پاسخ به تنش‌ها، دو شبکه پروتئین-پروتئین به‌صورت

جالب توجه اینکه بین سه کلتیوار حساس نیز ژن PR1 بیشترین میزان بیان را در کلتیوار Lira با مقدار ۶/۹ برابر نشان داد و در دو کلتیوار حساس دیگر میزان بیان به شدت کاهش یافت به‌طوری که میزان بیان یکی از ایزوفرم‌های این ژن در کلتیوار حساس Orshanskiy تحت سمیت آلومینیوم ۹/۸- به‌دست آمد (شکل ۴، الف). همچنین، ژن AT3G54420 در کلتیوار حساس Orshanskiy تحت سمیت آلومینیوم کاهش ۱۰ برابری را داشت (شکل ۴، الف). این ژن نوعی کیتیناز EP3 هست که در اندام‌ها مختلف به‌ویژه ریشه‌ها قرار دارد و نقش مهمی در حفاظت گیاهان در برابر انواع تنش‌ها به‌ویژه حمله پاتوژن‌های قارچی ایفا می‌کند. بیشترین کاهش

مجزا در کلتیوارهای مقاوم و حساس بر اساس MNC در Cytoscape رسم شد (شکل ۵). در بین کلتیوارهای حساس ژنهای PR4، AT2G3590، EP3، HCHIB و CHIA بیشترین برهمکنش را با سایر ژنها نشان دادند. ژن EP3 علاوه بر اینکه با سایر ژنهای هسته مشترک پاسخ به تنشها با درجه بالایی برهمکنش می دهد، بیشترین کاهش بیان را داشت و به شدت تحت تاثیر تنش سمیت آلومینیوم قرار گرفت. ژنهای هسته مشترک پاسخ به تنشها در کلتیوارهای مقاوم برهمکنشهای اولیه کمتری را بروز دادند و ۵۶/۶ درصد از ژنها گرههای ناپیوسته بودند که در شکل ۵ الف نمایش داده نشده است.

آنالیز مسیر ژنهای مشترک بررسی مسیرهای KEGG برای ژنهای مشترک کتان تحت هر دو تنش دلالت بر معنی داری ۳ مسیر براساس $FDR \leq 0.05$ و ۸ مسیر براساس $Pvalue \leq 0.05$ داشت که ۳ مسیر مرتبط با کلتیوار مقاوم و ۵ مسیر مرتبط با کلتیوار حساس بود. در بین این مسیرها ژنهای مرتبط با بیوستنز متابولیت های ثانویه و بیوستنز فنیل پروپانویدها که مختص این نوع گونه گیاهی است و در پاسخ به شرایط نامساعد محیطی نقش مهمی دارند، بیشترین تاثیر را داشتند (جدول ۴).



شکل ۵- شبکه برهمکنش های پروتئین-پروتئین بین ژنهای همپوشان کلتیوارهای مقاوم و حساس کتان زراعی تحت تنش کمبود روی و سمیت آلومینیوم؛ (الف) شبکه برهمکنش ژنهای همپوشان بین کلتیوارهای مقاوم، (ب) شبکه برهمکنش ژنهای همپوشان بین کلتیوارهای حساس. بین هر دو رقم حساس و مقاوم شبکه ای متصل ایجاد نشد.

جدول ۴- طبقه بندی مسیرهای KEGG برای ژنهای مشترک کتان زراعی تحت تنش کمبود روی و سمیت آلومینیوم نسبت به نمونه کنترل

کلتیوار	کد شناسایی KEGG	نام مسیر	تعداد ژن	P-value	FDR
مقاوم	ath00999	بیوستنز متابولیت های ثانویه گیاهان مختلف	۴	4.87E-04	0.0093
	ath01110	بیوستنز متابولیت های ثانویه	۹	0.005497878	0.0522
	ath00940	بیوستنز فنیل پروپانویدها	۳	0.040385377	0.2558
حساس	ath01110	بیوستنز متابولیت های ثانویه	۱۷	2.70E-04	0.0095
	ath00940	بیوستنز فنیل پروپانویدها	۵	0.004788491	0.064
	ath00520	متابولسم قند آمینه و قند نوکلئوتیدی	۵	0.00548769	0.064
	ath00999	بیوستنز متابولیت های ثانویه گیاهان مختلف	۳	0.047191687	0.3394
	ath01100	مسیرهای متابولیکی	۱۹	0.048479866	0.3394

بحث و نتیجه گیری کلی

pH خاک یکی از عوامل ضروری در جذب مواد مغذی است. زمانی که pH خاک نامناسب باشد اولین جایی که تنش را تجربه می کند، ریشه است. در ریشه عدم تعادل جذب مواد مغذی رخ می دهد که سبب مهار رشد، تغییر ارتفاع، حجم فیبر و عملکرد گیاه در هر دو کلتیوار مقاوم و حساس می شود (Kishlyan and TA 2010). در تحقیق حاضر، هسته مشترک پاسخ به تنش های pH نامناسب و عدم تعادل آلومینیوم و روی در ریشه کلتیوارهای مقاوم و حساس با استفاده از داده های RNA-Seq مطالعه شد. در این مطالعه تعداد DEGs در رقم مقاوم نوسان داشت اما در مجموع تعداد DEGs برای کلتیوارهای حساس بیشتر از کلتیوارهای مقاوم بود که نشان می دهد فعالیت متابولیک سلولی در رقم حساس نسبت به رقم مقاوم فعال تر است. در مطالعه آلودگی غلاف برگ برنج با *Rhizoctonia solani*، تعداد DEGs در غلاف برگ تلقیح شده ارقام مقاوم و حساس الگوی تنظیمی متفاوتی را نشان داد. با این وجود تعداد DEGs در رقم حساس همیشه بیشتر از رقم مقاوم بود (Yang et al. 2022). در پژوهشی دیگر بر روی گیاه یونجه آلوده با تریپس گزارش شد که تعداد DEGs یافت شده در رقم حساس حدود دو برابر تعداد DEGs در رقم مقاوم بود. با این حال ژن های پاسخگو به تنش مرتبط با آلودگی به پاتوژن در رقم مقاوم یونجه بیشتر از رقم حساس بود، زیرا رقم مقاوم با تولید اسیدهای چرب می تواند پاسخ ایمنی اختصاصی را ایجاد کند (Tu et al. 2018).

در این مطالعه ۳۰ و ۹۷ ژن مشترک به ترتیب برای کلتیوارهای مقاوم و حساس تحت تنش سمیت آلومینیوم و کمبود روی به دست آمد که چهار ژن مشترک بین رقم حساس و مقاوم بود. سپس ارزیابی GO آنها بر اساس فرآیندهای زیستی انجام شد. نتایج طبقه بندی GO نشان داد که فرآیندهای زیستی اختصاصی کتان، فرآیندهای متابولیکی و فرآیندهای سلولی بیشترین تعداد ژن ها را داشتند که حاکی از وضعیت فعال متابولیکی سلول است. GO های مرتبط با پاسخ به محرک ها نیز دارای بیشترین ژن های با تغییرات بیان معنی دار بودند. در این مطالعه، پاسخ به محرک ها در کلتیوارهای مقاوم شامل پاسخ به تنش ها، پاسخ های دفاعی، پاسخ به محرک های

غیرزیستی و پاسخ به مواد شیمیایی می باشد (شکل ۳). در مطالعه گذشته بر روی تنش آلومینیوم در کتان، GO های مرتبط با متابولیسم گلوکاتینون، اکسیدوردوکتاز و فعالیت انتقال دهنده های غشاء بیشترین تأثیر را از استرس داشتند (Krasnov et al. 2019). در برخی موارد، روندهای مشابهی در تغییرات بیان کلتیوارهای کتان مورد بررسی تحت تنش های مورد مطالعه مشاهده شد (Krasnov et al. 2019). در تحقیق ما به طور کلی فعالیت پراکسیدازها در کلتیوارهای حساس کاهش یافت در حالی که در کلتیوارهای مقاوم افزایش یافت. پراکسیدازها در مکانیسم سم زدایی گونه های فعال اکسیژن ها دخالت دارند و نقش آنها در تحمل به تنش ها به خوبی شناخته شده است (Bela et al. 2015; Pandey et al. 2017). آنها با بیان بالای ژن های کدکننده خود در برخی گونه های گیاهی موجب تحمل به تنش اکسیداتیو ثانویه ناشی از شرایط نامساعد محیطی می شوند (Daspute et al. 2017). بیان بیش از حد آرآبیدوپسیس پراکسیداز در گیاهان تنباکو باعث بهبود تحمل آنها به تنش آلومینیوم شد (Wu et al. 2017). در شرایط تنش کمبود روی در pH=7.5 بیان بالای ژن هایی کدکننده پراکسیدازها در هر دو کلتیوار مقاوم و حساس شناسایی شد (Dmitriev et al. 2019). در گیاه کتان تحت تنش سمیت آلومینیوم ژن های کد کننده پراکسیداز ۵ در هر دو ژنوتیپ کاهش یافت اما میزان کاهش آن در کلتیوار متحمل ۸ برابر بیشتر بود (Krasnov et al. 2019). پروفایل بیان ژن ها در GO ها با میزان تحمل به آلومینیوم ارتباط نداشت برای مثال فعالیت اکسیدوردوکتازها در کلتیوار Lira /TMP1919 و Orshanskiy/ Hermes به ترتیب مقاوم/ حساس مشابهت بیشتری باهم داشتند (Krasnov et al. 2019).

بیشترین تغییر بیان ژن در هر دو هسته مشترک ژن های پاسخگو به تنش بین کلتیوارهای مقاوم و حساس مربوط به ژن PR1 مشاهده شد. ایزوفرم های مختلف PR1 الگوهای بیانی متفاوتی را نشان داند به طوری که در کلتیوار مقاوم Hermes و کلتیوار حساس Lira تحت سمیت آلومینیوم میزان بیان آن به شدت افزایش یافت در حالی که در چهار کلتیوار دیگر به شدت کاهش یافت. خانواده ژن PR به طور گسترده ای به عنوان نشانگرهای مولکولی در پاسخ های دفاعی گیاه شناخته شده است (Liu et al. 2013). بیان این ژن در پاسخ به

(RAWAT et al. 2015). در حالی که در کلتیوارهای مقاوم استراتژی مقاومت متفاوت بود و بیان ژنهای تغییر دهنده دیواره سلولی از جمله XTH8 و XTH16، و ژنهای FLA2، sks4 و TUB6 بیشترین ارتباط را با سایر پروتئینها داشتند و در پاسخ به تنشها دخالت دارند (Reim et al. 2022).

آنالیز مسیرهای KEGG برای ژنهای مشترک کتان تحت هر دو تنش نشان داد که در بین این مسیرها ژنهای مرتبط با بیوسنتز متابولیتهای ثانویه و بیوسنتز فنیل پروپانویدها در پاسخ به شرایط نامساعد محیطی نقش مهمی دارند. در کلتیوارهای حساس مسیرهای دیگر هم تغییر بیان معنی داری نشان دادند. این حالت نشان می دهد که گیاه برای حفظ حالت پایدار خود در پاسخ به محرکها انرژی بیشتری را مصرف می کند در حالی که در کلتیوارهای مقاوم به طور اختصاصی تر مسیرهای متابولیتهای ثانویه تغییر کردند. به طور کلی تحقیقات روی ژنهای مقاومت و مسیرهای مرتبط نشان داده است که مکانیسم تحمل یک صفت پیچیده است که توسط ژنهای متعدد و مسیرهای مختلف کنترل می شود (Liu et al. 2022). بنابراین انتخاب دقیق استراتژی تنظیم بیان ژن در طول تنشهای چندگانه تحت تأثیر عواملی مانند شدت تنش، دوره زمانی تنش، سن گیاه و ژنوتیپ متحمل یا حساس به هر یک از تنشهای فردی می باشد (Rivero et al. 2022). در این تحقیق، تعدادی از ژنهای کاندید را برای مطالعه برای بهبود تحمل به تنش کتان و در نتیجه بهبود عملکرد در شرایط تنشهای موجود در خاک و عدم تعادل مواد مغذی ارائه کردیم که می تواند برای برنامه های اصلاحی و مهندسی ژنتیک مورد استفاده قرار گیرد.

محرکها به ویژه عوامل بیماریزا به سرعت القا می شود (Mitsuahara et al. 2008). در یک مطالعه ای تحت تنش غیرزیستی خشکی بیان PR1 افزایش یافت، به طوری که منجر به افزایش تحمل به تنش خشکی نسبت به گیاهان کنترل شد (Liu et al. 2022). بیشترین کاهش بیان در کلتیوار مقاوم در ژن MLP-like protein 423 برای Norlin تحت تنش کمبود روی مشاهده شد در حالی که بیان این ژن در Hermes افزایش یافت. بیان خانواده ژن MLP در بافت های مختلف به طور قابل توجهی متفاوت است و در پاسخ دفاعی و مسیر سیگنالینگ فعال شده توسط ABA درگیر می باشد (Singh et al. 2022). در گیاه تنباکو NtMLP 423 تحمل به خشکی را با افزایش سطوح ABA تنظیم نمود. همچنین، بیان بیش از حد NtMLP423 آسیب به غشاء و تجمع ROS را کاهش داد و بیان ژنهای مرتبط با استرس را نیز افزایش داد (Liu et al. 2020). در مطالعه ای بیان بیش از حد GhMLP منجر به افزایش محتوای فلاونوئید آرابیدوپسیس شد در نتیجه تحمل به تنش شوری را بهبود بخشید (Chen and Dai 2010) همچنین در تحقیق حاضر در کلتیوار حساس Orshanskiy، بیان ژن EP3 تحت سمیت آلومینیوم کاهش ۱۰ برابری را داشت. این ژن نوعی کیتیناز است که مانند PR1 در پاسخ دفاعی به تنشها به ویژه حمله عوامل بیماریزا نقش دارد (Boba et al. 2021). در شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین ژنهای مشترک کلتیوارهای حساس نیز نشان داده شد که ژن EP3 به همراه سه نوع کیتیناز دیگر CHIA، HCHIB و AT2G43590 و ژن PR4 بیشترین ارتباط را با سایر پروتئینها دارد و نقش مهمی در سیستم دفاعی کتان در هر دو تنش ایفا می کنند که در سایر گیاهان نیز نقش دفاعی آنها به خوبی شناخته شده است.

منابع

Anders S, Pyl PT, Huber W (2015) HTSeq-a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *bioinformatics* 31:166-169.
Bela K, Horváth E, Gallé Á, Szabados L, Tari I, Csiszár J (2015) Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Journal of Plant Physiology* 176:192-201
Boba A, Kostyn K, Kozak B, Zalewski I, Szopa J, Kulma A (2021) Transcriptomic profiling of susceptible and resistant flax seedlings after *Fusarium oxysporum* lini infection. *PLoS One* 16:e0246052.

Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114-2120.
Chen J-Y, Dai X-F (2010) Cloning and characterization of the *Gossypium hirsutum* major latex protein gene and functional analysis in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 231:861-873.
Cohen SP, Leach JE (2019) Abiotic and biotic stresses induce a core transcriptome response in rice. *Scientific Reports* 9:1-11

- Daspute AA, Sadhukhan A, Tokizawa M, Kobayashi Y, Panda SK, Koyama H (2017) Transcriptional regulation of aluminum-tolerance genes in higher plants: clarifying the underlying molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science* 8:1358.
- Dmitriev AA, Krasnov GS, Rozhmina TA, Kishlyan NV, Zyablitsin AV, Sadritdinova AF, Snezhkina AV, Fedorova MS, Yurkevich OY, Muravenko OV, et al (2016) Glutathione S-transferases and UDP-glycosyltransferases are involved in response to aluminum stress in flax. *Frontiers in Plant Science* 7:1920.
- Dmitriev AA, Krasnov GS, Rozhmina TA, Zyablitsin A V., Snezhkina A V., Fedorova MS, Pushkova EN, Kezimana P, Novakovskiy RO, Povkhova L V., et al (2019) Flax (*Linum usitatissimum* L.) response to non-optimal soil acidity and zinc deficiency. *BMC Plant Biology* 19:5-15.
- Dmitriev AA, Kudryavtseva A V, Bolsheva NL, Zyablitsin A V, Rozhmina TA, Kishlyan N V, Krasnov GS, Speranskaya AS, Krinitsina AA, Sadritdinova AF (2017) *miR319*, *miR390*, and *miR393* are involved in aluminum response in flax (*Linum usitatissimum* L.). *BioMed research international*. 2017.
- Du Z, Zhou X, Ling Y, Zhang Z, Su Z (2010) agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Research*. 38, W64–W70.
- Eekhout T, Larsen P, De Veylder L (2017) Modification of DNA checkpoints to confer aluminum tolerance. *Trends in plant science* 22:102-105
- Gondal AH, Hussain I, Ijaz AB, Zafar A, Ch BI, Zafar H, Sohail MD, Niazi H, Touseef M, Khan AA (2021) Influence of soil pH and microbes on mineral solubility and plant nutrition: A review. *International Journal of Agriculture and Biological Sciences* 5:71-81.
- Gong F, Qi T, Hu Y, Jin Y, Liu J, Wang W, He J, Tu B, Zhang T, Jiang B (2022) Genome-Wide Investigation and Functional Verification of the ZIP Family Transporters in Wild Emmer Wheat. *International journal of molecular sciences* 23:2866.
- Gupta N, Ram H, Kumar B (2016) Mechanism of Zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 15:89-109.
- Jhala AJ, Hall LM (2010) Flax (*Linum usitatissimum* L.): Current uses and future applications. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 4:4304-4312.
- Khadem A, Golchin A, Mashhadi Jafarloo A, Zaree E, Naseri E (2015) Effect of Highly Acidified Soil on Soil Nutrient Availability and Corn (*Zea mays* L.) Growth. *Applied Field Crops Research* 28:1-7.
- Kishlyan N V, TA R (2010) Ocenka genofonda lna kulturnogo (*Linum usitatissimum* L.) po kislotoustojchivosti. *Agric Biol* 1:96-103.
- Krasnov GS, Dmitriev AA, Zyablitsin A V., Rozhmina TA, Zhuchenko AA, Kezimana P, Snezhkina A V., Fedorova MS, Novakovskiy RO, Pushkova EN, et al (2019) Aluminum responsive genes in flax (*Linum usitatissimum* L.). *BioMed Research International* 2019.
- Liu H, Ma X, Liu S, Du B, Cheng N, Wang Y, Zhang Y (2020) The *Nicotiana tabacum* L. major latex protein-like protein 423 (*NtMLP423*) positively regulates drought tolerance by ABA-dependent pathway. *BMC plant biology* 20:1-14.
- Liu J, Magalhaes JV, Shaff J, Kochian LV (2009) Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. *The Plant Journal* 57:389-399.
- Liu T, Chen T, Kan J, Yao Y, Guo D, Yang Y, Ling X, Wang J, Zhang B (2022) The *GhMYB36* transcription factor confers resistance to biotic and abiotic stress by enhancing PR1 gene expression in plants. *Plant biotechnology journal* 20:722-735.
- Liu W-X, Zhang F-C, Zhang W-Z, Song L-F, Wu W-H, Chen Y-F (2013) Arabidopsis Di19 functions as a transcription factor and modulates PR1, PR2, and PR5 expression in response to drought stress. *Molecular plant* 6:1487-1502.
- Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*. 15:1-21.
- Mitsuhara I, Iwai T, Seo S, Yanagawa Y, Kawahigasi H, Hirose S, Ohkawa Y, Ohashi Y (2008) Characteristic expression of twelve rice *PR1* family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (121/180). *Molecular Genetics and Genomics* 279:415-427
- Neina D (2019) The role of soil pH in plant nutrition and soil remediation. *Applied and Environmental Soil Science*. 2019.
- Pandey S, Fartyal D, Agarwal A, Shukla T, James D, Kaul T, Negi YK, Arora S, Reddy MK (2017) Abiotic stress tolerance in plants: myriad roles of ascorbate peroxidase. *Frontiers in plant science* 8:581
- Pertea, M., Kim, D., Pertea, G.M., Leek, J.T., Salzberg, S.L., 2016. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat. Protoc.* 11:1650-1667.
- Ramzi E, Asghari A, Khomari S, Mohammaddoust e Chamanabad H (2018) Investigation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum Desf) lines for tolerance to aluminum stress condition. *Journal of Crop Breeding* 10:63-72
- RAWAT S, GROVER A, CHANDRASHEKAR N, ALI S (2015) Gene expression profiling of *Arabidopsis thaliana* chitinase genes in response to *Alternaria brassicae* challenge.
- Reim S, Winkelmann T, Cestaro A, Rohr A-D, Flachowsky H (2022) Identification of Candidate Genes Associated With Tolerance to Apple Replant Disease by Genome-Wide Transcriptome Analysis. *Frontiers in Microbiology* 13:888908.
- Rivero RM, Mittler R, Blumwald E, Zandalinas SI (2022) Developing climate-resilient crops: improving plant tolerance to stress combination. *Plant Journal* 109: 373–389
- Rozhmina TA, Pavlova LN, Melnikova N V, Golubeva LM (2017) Rol'genofonda l'na v selekcii na adaptivnost'. *Uspekhi Sovremennoj Nauki*:184-189.
- Sadeghzadeh B, Ghodsizad L, Sadeghzadeh N, Sepehr I, Feizi M (2021) Cereal Breeding For Zinc Deficiency and Its

- Importance to Alleviate Drought Stress. *Journal of Crop Breeding* 13:22-40.
- Shavrukov Y, Hirai Y (2016) Good and bad protons: genetic aspects of acidity stress responses in plants. *Journal of experimental botany* 67:15-30.
- Sinclair SA, Krämer U (2012) The zinc homeostasis network of land plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1823:1553-1567.
- Smoot, M.E., Ono, K., Ruscheinski, J., Wang, P.-L., Ideker, T., 2011. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics* 27:431-432.
- Suyama T, Yamada K, Mori H, Takeno K, Yamaki S (1999) Cloning cDNAs for genes preferentially expressed during fruit growth in cucumber. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124:136-139.
- Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R (2014) Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist* 203:32-43.
- Tu X, Liu Z, Zhang Z (2018) Comparative transcriptomic analysis of resistant and susceptible alfalfa cultivars (*Medicago sativa* L.) after thrips infestation. *BMC Genomics* 19:1-8.
- Wang N, Qiu W, Dai J, Guo X, Lu Q, Wang T, Li S, Liu T, Zuo Y (2019) AhNRAMP1 enhances manganese and zinc uptake in plants. *Frontiers in plant science* 10:415.
- Wu Y, Yang Z, How J, Xu H, Chen L, Li K (2017) Overexpression of a peroxidase gene (*AtPrx64*) of *Arabidopsis thaliana* in tobacco improves plant's tolerance to aluminum stress. *Plant molecular biology* 95:157-168.
- Yan L, Riaz M, Liu J, Yu M, Cuncang J (2022) The aluminum tolerance and detoxification mechanisms in plants; recent advances and prospects. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 52:1491-1527.
- Yang X, Gu X, Ding J, Yao L, Gao X, Zhang M, Meng Q, Wei S, Fu J (2022) Gene expression analysis of resistant and susceptible rice cultivars to sheath blight after inoculation with *Rhizoctonia solani*. *BMC Genomics* 23:1-16.
- Zyablitsin A V, Dmitriev AA, Krasnov GS, Bolsheva NL, Rozhmina TA, Muravenko O V, Fedorova MS, Snezhkina A V, Kudryavtseva A V, Melnikova N V (2018) CAX3 gene is involved in flax response to high soil acidity and aluminum exposure. *Molecular Biology* 52:514-519.