

DOR: 20.1001.1.15625540.1401.24.1.6.7

تجزیه و تحلیل ترنسکریپتوم با رهیافت شبکه در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به تنش شوری
ذرت (*Zea mays* L.)Network-based transcriptome analysis in salt tolerant and salt sensitive maize
(*Zea mays* L.) genotypesظاهر محصلی^۱، سارا دژستان^۲، رضا درویش زاده^۳

چکیده

محصلی، ط.، س. دژستان و ر. درویش زاده. ۱۴۰۱. تجزیه و تحلیل ترنسکریپتوم با رهیافت شبکه در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به تنش شوری ذرت (*Zea mays* L.). نشریه علوم زراعی ایران. ۲۴ (۱): ۹۲-۷۹.

شناسایی ژن‌های دخیل در تنش شوری، درک عمیقی از سازوکار تحمل به شوری در گیاه ذرت فراهم می‌کند. آزمایش حاضر در سال ۱۳۹۷ در دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه با هدف شناسایی تفاوت‌های ژنتیکی دو ژنوتیپ ذرت در تحمل به تنش شوری انجام و نتایج بیان ژن با شبکه‌های برهمکنش ژنی ادغام شد. ابتدا با استفاده از غربالگری فنوتیپی دو ژنوتیپ با تفاوت‌های فنوتیپی بارز در تحمل به تنش شوری شناسایی شدند. برای دو ژنوتیپ منتخب (T9: متحمل به تنش شوری؛ S46: حساس به تنش شوری)، بیان ژن‌ها با کمک توالی‌یابی RNA برای آشکارسازی سازوکارهای مولکولی زمینه‌ساز تفاوت در تحمل به شوری مطالعه شد. با هستی‌شناسی ژن (GO enrichment) و تجزیه و تحلیل شبکه‌های برهمکنش روی ژن‌های با افتراق بیان، مسیرهای انتقال پیام وابسته به فسفوریلاسیون، انتقال یون، فرآیندهای اکسیداسیون، متابولیسم گلوکوتایون و تریپتوفان بین ژنوتیپ‌های متحمل و حساس شناسایی شدند. در نتایج آنالیز شبکه، در ناحیه راه‌انداز ژن‌های متعلق به خوشه با فعالیت فسفوریلاسیون و کینازی، یک بن‌مایه (موتیف) به‌عنوان عنصر تنظیمی (Cis-regulatory element) مشترک یافت شد. این بن‌مایه با یک عنصر تنظیمی شناخته شده در گیاه آراییدوپسیس که محل اتصال یک فاکتور رونویسی با نقش شناخته شده در پاسخ به تنش شوری است، مطابقت داشت. با ادغام داده‌های بیان ژن و شبکه برهمکنش، مسیرها و ژن‌های متمایزکننده که در دو ژنوتیپ متحمل و حساس به تنش شوری شناسایی شدند؛ می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی و بیوتکنولوژی برای بهبود عملکرد ذرت تحت تنش شوری استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: بن‌مایه (موتیف)، تنش شوری، توالی‌یابی RNA، ذرت، شبکه برهمکنش ژنی و عامل رونویسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۷ این مقاله مستخرج از رساله دکتری نویسنده اول و بخشی از طرح تحقیقاتی شماره ۹۴/۱۰۷/T.T. مصوب پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه می‌باشد.
۱- دانشجوی دکتری دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۲- دانشیار دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: sdezhetan@uma.ac.ir)
۳- استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir)

مقدمه

ذرت (*Zea mays* L.) به عنوان یکی از مهم ترین گیاهان زراعی و محصولات غذایی در جهان نقش و موقعیت قابل توجهی را در میان گیاهان به خود اختصاص داده است (Nawaz et al., 2020). ذرت بعد از گندم و جو، بیشترین سهم را در تولید محصولات غذایی در بین غلات به خود اختصاص داده است (Naseem et al., 2020).

استفاده بی رویه انسان از منابع طبیعی و تغییرات شرایط آب و هوایی، انواع مختلفی از تنش های غیر زیستی را به دنبال داشته است. شوری یکی از انواع تنش های غیر زیستی و یکی از عوامل اصلی محدود کننده رشد و بهره وری محصولات کشاورزی، به ویژه در مناطق خشک و نیمه خشک محسوب می شود (Abdelaal et al., 2020). یکی از مهم ترین پیامدهای تنش شوری تولید گونه های اکسیژن فعال (ROS) در گیاه است که به دنبال آن آسیب های اکسیداتیو ایجاد می شود. تخریب پروتئین ها، لیپیدها، رنگدانه ها و DNA اصلی ترین پیامدهای تنش اکسیداتیو هستند (Das and Roychoudhury, 2014).

با گسترش فناوری های توالی یابی با توان عملیاتی بالا، محققان روش جدیدی به نام توالی یابی RNA (RNA-seq) برای مقایسه الگوی بیان ژن ها و شناسایی ژن های مؤثر در تحمل شوری برای تشریح سازوکار مولکولی تحمل در گیاهان ارائه کرده اند (Wang et al., 2009). لی و همکاران (Li et al., 2017) الگوی رونویسی ژن ها را در گیاه کنف در شرایط تنش شوری با استفاده از فناوری RNA-seq بررسی کردند. در این تحقیق ۳۷۰ رونوشت از ۱۵ خانواده عامل رونویسی مرتبط با پاسخ به تنش شوری شناسایی شدند. آنالیز هستی شناسی ژن نشان داد که ژن های رمز کننده آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند پراکسیداز، گلوتاتیون ترانسفراز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون ردوکتاز هنگام اعمال تنش شوری در گیاه فعال شدند.

ژو و همکاران (Zhou et al., 2016) برای شناسایی سازوکارهای ژنتیکی - مولکولی دخیل در تحمل تنش شوری در برنج وحشی (*Oryza rufipogon*)، از پلنفورم Illumina HiSeq 2000 جهت تجزیه و تحلیل الگوی بیان رونوشت ژن ها در برگ و ریشه گیاهچه ها در شرایط طبیعی (بدون تنش) و شوری استفاده کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که ۶۸۶۷ رونوشت در برگ و ۴۹۸۸ رونوشت در ریشه به صورت متفاوت بیان شدند. در میان ژن هایی که به صورت افتراقی بیان شده بودند، عوامل رونویسی مانند NAC و MYB شناسایی شدند که نشان دهنده دخیل بودن شبکه های تنظیمی چند بعدی در تنش شوری هستند. به علاوه تعداد دیگری از ژن ها مانند ZFP179، ZFP182 و ZFP252 در پاسخ به تنش شوری شناسایی و گزارش شدند. تجزیه و تحلیل ترنسکرپتوم، ژن هایی را شناسایی می کند که میزان بیان آن ها در مقایسه بین شرایط و یا ژنوتیپ های مختلف به طور قابل توجهی تغییر نشان می دهند. اگرچه مطالعه ترنسکرپتوم برای شناسایی فرآیندهای زیستی که تحت شرایط مورد مطالعه فعال یا مهار می شوند کارآمد است، اما سازوکارهای بالادستی که تغییرات پایین دستی مشاهده شده را به صورت سیستمی تنظیم می کنند، اغلب ناشناخته باقی مانده اند (Li et al., 2020). علاوه بر این، از لحاظ آماری تجزیه و تحلیل ترنسکرپتوم با خطای نوع یک (نتایج مثبت کاذب) و خطای نوع دوم (نتایج منفی کاذب) همراه می باشد. این موضوع از یک سو باعث شناسایی ژن هایی می شود که در واقع در فرآیند مورد مطالعه درگیر نیستند (خطای نوع یک) و از سوی دیگر ژن های واقعی درگیر که در سطح بیانی تنظیم نمی شوند و یا تغییرات بیان بسیار نامحسوس اما بسیار تأثیرگذار دارند، ناشناخته باقی می ماندند (خطای نوع دوم) (García-Ortega and Martínez, 2015). با ادغام اطلاعات مولکولی در دسترس در قالب شبکه های برهمکنش مولکولی با داده های بیانی، می توان از اطلاعات موجود و نتایج مطالعات پیشین برای به حداقل

تنظیم نمی‌شوند (مانند بسیاری از عوامل رونویسی)، از طریق ارتباط با ژن‌های واقعی درگیر در یکی از خوشه‌های استخراج شده، به‌طور غیرمستقیم بازیابی شده و به فهرست نتایج اضافه خواهند شد. چنین تجزیه و تحلیل ادغامی این امکان را فراهم می‌کند تا دید جامع‌تری در مورد فرایند مورد نظر به دست آید (Suravajhala *et al.*, 2016).

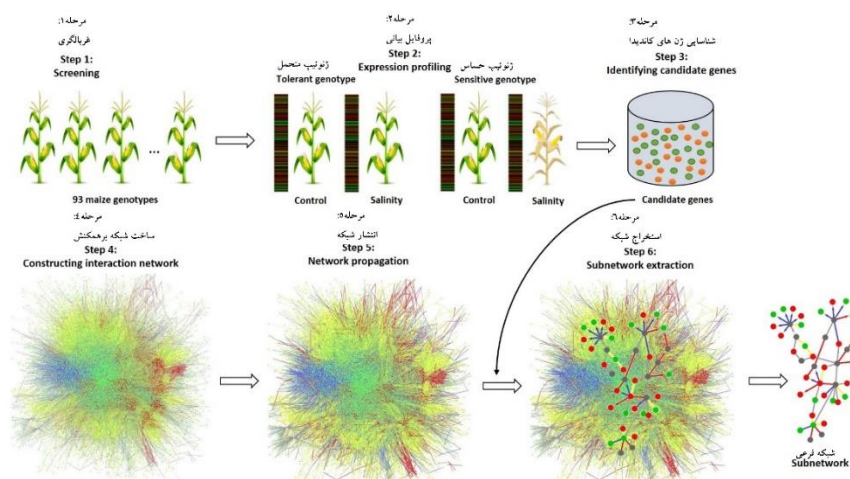
تحقیق حاضر با هدف شناسایی سازوکارهای مولکولی متمایزکننده دو ژنوتیپ ذرت از نظر تحمل به تنش شوری، با استفاده از تجزیه و تحلیل مبتنی بر شبکه انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش که در سال ۱۳۹۷ در دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه انجام شد، ۹۳ ژنوتیپ ذرت که از چندین مرکز تحقیقاتی (دانشگاه رازی کرمانشاه، مرکز تحقیقات کشاورزی مشهد و مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج) تهیه شده بودند، از نظر تحمل به تنش شوری در گلدان‌های آزمایشی در شرایط مزرعه مورد ارزیابی قرار گرفتند. تجزیه تحمل به تنش شوری بر اساس صفات محتوای آب نسبی برگ (RWC)، نسبت پتاسیم به سدیم در برگ و عملکرد دانه در بوته انجام شد. براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای انجام گرفته برای صفات مورد مطالعه و همچنین با در نظر گرفتن فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها، دو ژنوتیپ T9 (متحمل) و S46 (حساس) به تنش شوری انتخاب شده و ترنسکریپتوم آن‌ها در شرایط بدون تنش و تنش شوری مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۱).

به‌منظور شناسایی ژن‌های کاندیدا در تحمل به تنش شوری، دو ژنوتیپ ذرت منتخب ذکر شده، در اتاقک رشد در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار زیستی کشت شدند. کشت گیاهان به‌صورت نیمه-هیدروپونیک و در گلدان‌های حاوی پرلیت و

رسانی خطای نوع اول و دوم استفاده کرد. تجزیه و تحلیل شبکه، روشی کارآمد برای ادغام داده‌های تجربی حاصل از نتایج مطالعه سطوح مختلف مولکولی با کلیه اطلاعات مولکولی موجود می‌باشد (Suravajhala *et al.*, 2016). به‌عنوان نمونه در یک تحقیق با استفاده از آنالیز شبکه برهمکنش، ژن‌های کاندیدایی در پاسخ به تنش خشکی در سورگوم شناسایی شدند که در بیوسنتز اسید آسزیک و انتقال پیام درگیر بوده و نقش کلیدی در بهبود تحمل به تنش در این گیاه ایفا می‌کنند (Woldesemayat and Ntwasa, 2018). تجزیه و تحلیل شبکه هم‌پایانی در ذرت نیز برای شناسایی ماژول‌های (گروه‌های ژنی) هم‌پایان و تعیین اینکه چگونه با شاخص‌های فیزیولوژیکی مرتبط با تنش خشکی همبستگی دارند، استفاده شده است (Virilouvet *et al.*, 2018). در آزمایش دیگری در گیاه آراییدوپسیس با استفاده از تجزیه و تحلیل شبکه، یک شبکه رونویسی کنترل‌کننده مهار رشد برگ در پاسخ به تنش اسمزی شناسایی شد. این شبکه از ۲۰ فاکتور رونویسی تشکیل شده است که الگوهای پیچیده سازگاری با تغییرات محیطی را امکان‌پذیر می‌کند (Van den Broeck *et al.*, 2017). در تجزیه و تحلیل شبکه، می‌توان ژن‌های کاندیدای شناسایی شده حاصل از مطالعه ترنسکریپتوم را در شبکه برهمکنش مولکولی مورد بررسی قرار داد. در همین راستا خوشه‌هایی از این شبکه برهمکنش که در آن‌ها بیشترین ارتباط بین ژن‌های کاندیدا برقرار است، به‌عنوان اصلی‌ترین فرایندهای بیولوژیکی درگیر استخراج می‌شوند (Jiang *et al.*, 2020). علاوه بر این، ژن‌های کاندیدایی که جزئی از هیچ‌کدام از خوشه‌های شناسایی شده نباشند، به‌احتمال زیاد نقشی را در فرآیند مورد بررسی (برای این مطالعه تنش شوری) نداشته و از فهرست نتایج حذف خواهند شد. همچنین، ژن‌های درگیر در فرآیند مورد نظر که در سطح بیان،



شکل ۱- بررسی ژن‌های کاندیدا حاصل از نتایج بیان ژن در شبکه برهمکنش به منظور استخراج خوشه‌های درگیر در

تنش شوری

غربالگری فوتویی: از ۹۳ ژنوتیپ ذرت، دو ژنوتیپ با رفتار فوتویی بسیار متفاوت از نظر تنش شوری (T9: متحمل، S46: حساس) انتخاب شدند. پروفایل بیان ژن: بیان ژن‌های ژنوتیپ T9 و S46 در شرایط عادی و تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت. انتخاب ژن‌های کاندیدا: ژن‌هایی که بین دو ژنوتیپ به تنش شوری واکنش متفاوتی داشتند، به عنوان ژن‌های کاندیدا (ژن‌های قرمز رنگ در سمت راست نقشه حرارتی) انتخاب شدند. تجزیه و تحلیل شبکه: شبکه برهمکنش ادغامی از لایه‌های مختلف مولکولی تهیه شد (شبکه‌های تنظیمی، شبکه‌های برهمکنش پروتئین-پروتئین، شبکه‌های متابولیکی و شبکه‌های هم‌بیان) و متعاقباً به یک شبکه برهمکنش وزن‌دار تبدیل شد. ژن‌های کاندیدا بر روی این شبکه برهمکنش وزن‌دار مورد بررسی قرار گرفتند. خوشه‌های معنی‌دار با استفاده از PheNetic استخراج شدند. گره‌های قرمز ژن‌های کاندیدا هستند که با بیان افتراقی در یکی از ژنوتیپ‌ها شناسایی شدند و گره‌های خاکستری نشان‌دهنده ژن‌های رابطی هستند که خود کاندیدا نبوده، اما ارتباط بین ژن‌های کاندیدا را در شبکه برهمکنش فراهم می‌کنند و توسط تجزیه و تحلیل شبکه بازیابی شده‌اند.

Fig. 1. Evaluation of candidate genes obtained from the results of gene expression in the interaction network in order to identify sub-networks involved in salinity stress

Phenotypic screening: Two genotypes were selected out of 93 maize genotypes, which showed extremely different phenotypic response against salinity stress (T9: Tolerant, S46: Sensitive). Gene expression profiling: gene expression of T9 and S46 genotypes was investigated under normal and salinity conditions. Candidate gene selection: The genes responded differently to salinity stress between two genotypes were selected as candidate genes (red genes on the right hand side of the Heatmap). Network Analysis: an integrated interaction network was compiled from different molecular layers (regulatory networks, protein-protein interaction networks, metabolic networks and co-expression networks) and was subsequently converted to a probabilistic interaction network. Candidate genes were mapped on this probabilistic interaction network. Significant sub-networks were extracted using PheNetic. The Red nodes are candidate genes (which were identified by differential expression in one of the genotypes) and the grey nodes indicate connector genes that are not candidate but provide a link between the candidate genes in the interaction network that have been recovered by network analysis.

پیت‌ماس با نسبت دو به سه انجام شد. جوانه‌زنی بذرها در دمای ۲۲ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی انجام گرفت. در طول دوره رشد، از محلول غذایی هوگلند برای تغذیه و آبیاری پوته‌ها استفاده شد. در مرحله هشت برگی به نصف تعداد گلدان‌های هر ژنوتیپ (سه تکرار) تنش شوری (هشت دسی زیمنس بر متر) اعمال شده و نصف دیگر گلدان‌های هر ژنوتیپ (سه تکرار) در شرایط بدون تنش (صفر دسی زیمنس بر متر) به رشد خود ادامه دادند. شوری بیش از ۸/۶ دسی زیمنس بر متر باعث از دست رفتن بیش از ۵۰ درصد از عملکرد ذرت و وارد آمدن صدمات غیر قابل برگشت به گیاه می‌شود (Hussain *et al.*, 2019). نمونه‌برداری از برگ نمونه‌ها در دو زمان (۷ و ۱۲ روز بعد از اعمال تنش) انجام شد. نمونه‌های زمان‌های نمونه‌برداری برای سطح بدون تنش و برای سطح تنش برای هر یک از ژنوتیپ‌های متحمل و حساس در تکرارهای اول و دوم

پیت‌ماس با نسبت دو به سه انجام شد. جوانه‌زنی بذرها در دمای ۲۲ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی انجام گرفت. در طول دوره رشد، از محلول غذایی هوگلند برای تغذیه و آبیاری پوته‌ها استفاده شد. در مرحله هشت برگی به نصف تعداد گلدان‌های هر ژنوتیپ (سه تکرار) تنش شوری (هشت دسی زیمنس بر متر) اعمال شده و نصف دیگر گلدان‌های هر ژنوتیپ (سه تکرار) در شرایط بدون تنش (صفر دسی زیمنس بر

شدند. برای شناسایی ژن‌های کاندیدا با استفاده از این مدل از بسته آماری edgeR استفاده شد. نقش زیستی (GO annotation) هر ژن از سایت maizedb.org دریافت شده و نمودار GO با استفاده از برنامه R و سایت Plaza رسم شد.

شبکه برهمکنش پروتئینی ذرت از پایگاه داده PPIM دریافت شد. با توجه به اینکه در پایگاه داده PPIM از نسخه قدیمی ژنوم مرجع (ژنوم مرجع B73-v3) استفاده شده است، شناسه ژن‌ها به شناسه ژنوم مرجع B73-v4 تبدیل شد. شبکه برهمکنش پروتئین بدست آمده شامل ۱۰۸۶۸ گره (پروتئین) و ۱۵۷۹۳۴ برهمکنش به عنوان یال است. برهمکنش‌های متابولیکی ذرت از KEGG دریافت شد و با استفاده از KEGGgraph (Zhang and Wiemann, 2009) به شبکه تبدیل شد که متشکل از ۵۴۸۰۷ یال بین ۴۰۵۲ گره می‌باشد. شبکه تنظیمی ذرت از PlantRegMap (<http://plantregmap.cbi.pku.edu.cn/>) با ۱۲۷۵۹ یال بین ۵۲۵۱ ژن دریافت شد. سه شبکه به دست آمده ادغام شدند. یال‌های تکراری (دو یا سه یال بین دو گره) به این صورت حذف شدند که اگر یال تکراری جزئی از شبکه KEGG باشد (به عنوان منبع معتبر)، این یال به عنوان یال متابولیک حفظ شده و تمام یال‌های اضافی دیگر حذف می‌شوند. در غیاب یال KEGG، یال شبکه تنظیمی به یال شبکه پروتئینی ترجیح داده شد که نتیجه آن حذف یال شبکه برهمکنش پروتئینی و حفظ یال تنظیمی است.

با وجود در دسترس بودن نسخه ارتقاء یافته ژنوم B73 (AGPv4)، اکثر شبکه‌های برهمکنش ذرت هنوز بر اساس نسخه قدیمی (v3) بوده و به روزرسانی نشده‌اند. با توجه به اینکه نسخه v4 شامل تعداد زیادی ژن جدید شناسایی شده است که در نسخه‌های قدیمی وجود ندارند، تبدیل شناسه بین نسخه‌های قدیمی و نسخه v4 کافی به نظر نمی‌رسد. برای رفع این اشکال از داده‌های بیانی برگرفته از بافت‌ها و محیط‌های

باهم مخلوط و از آن‌ها برای استخراج RNA استفاده شد. استخراج rRNA کل از هر نمونه با استفاده از محلول استخراج RNX-Plus TM (سیناکلون، ایران)، طبق توصیه شرکت سازنده انجام شد. پس از اطمینان از بالا بودن کمیت و کیفیت RNAهای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و اسپکتروفتومتر، نمونه‌های RNA جهت توالی‌یابی به شرکت Berry Genomics در چین ارسال شدند. در شرکت ذکر شده بعد از تهیه کتابخانه cdNA از نمونه‌های ارسالی، توالی‌یابی با استفاده از دستگاه Illumina Novaseq 6000 (150 bp paired-end) انجام شد.

کنترل کیفیت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Fastqc انجام شد. بعد از این مرحله، حذف نوکلئوتیدهای کم کیفیت ابتدا و انتهای خوانش‌ها، خوانش‌های بی کیفیت و بازمانده‌های آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic انجام شد (Bolger *et al.*, 2014). در ادامه خوانش‌های بدست آمده با ژنوم مرجع هم‌ردیف شدند تا موقعیت مکانی خوانش‌ها روی ژنوم مرجع مشخص شود (Amirbakhtiar *et al.*, 2019). هم‌ردیفی خوانش‌ها با ژنوم مرجع (*Zea_mays.B73_RefGen_v4.dna.toplevel.fa.gz*) با استفاده از نرم‌افزار Hisat2 انجام شد (Kim *et al.*, 2019). برای تجزیه و تحلیل بیان افتراقی ژن‌ها از بسته آماری edgeR در سطح اطمینان ۹۵ درصد و در نظر گرفتن آزمون‌های چندگانه ($FDR < 0.05$) و نسبت بیان بیش از ۱/۵ ($Fold-change > 1.5$) به عنوان معیار معنی‌داری، استفاده شد. در این تحقیق شناسایی ژن‌های کاندیدا (ژن‌هایی که تفاوت رفتار فنوتیپی بین ژنوتیپ حساس و متحمل در پاسخ به تنش شوری را توجیه کنند) مورد نظر بوده و برای شناسایی این ژن‌ها از مدل آماری ANCOVA استفاده شد. در اینجا بیان هر ژن به عنوان متغیر پاسخ و "تیمار شوری" و "ژنوتیپ" به عنوان متغیرهای توضیحی در مدل در نظر گرفته

شوری دارند. با این حال، این نتایج تنها با پوشش دادن ۱۲ ژن کاندیدا حاصل شد (شکل ۲) و ۱۰۱ ژن دیگر به مسیرهای بیولوژیکی دیگری تعلق داشتند. این نتایج نشان می‌دهد که بخش قابل توجهی از سازوکار تحمل به شوری با تجزیه و تحلیل GO قابل شناسایی نمی‌باشد.

برای درک بهتر سازوکارهای درگیر در تحمل به شوری که با ژن‌های کاندیدا میانجی‌گری می‌شوند، تجزیه و تحلیل مبتنی بر شبکه انجام شد. در نتیجه خوشه‌هایی (Sub-network) شناسایی شدند که بیشترین ژن کاندیدا را با کمترین تعداد یال پوشش دهند (De Maeyer *et al.*, 2013). مزیت این روش این است که کلیه اطلاعات مولکولی در دسترس برای ذرت و همچنین اطلاعات مشتق شده از داده‌های بیانی سایر مطالعات می‌تواند در قالب شبکه برهمکنش برای استخراج نتایج و نتیجه‌گیری بهتر به کار گرفته شود. به این ترتیب، ژن‌های با افتراق بیان کمتر شناخته شده (ژن‌هایی که هنوز به هیچ کدام از مسیرهای GO نسبت داده نشده‌اند) را می‌توان به یک مسیر زیستی مشترک نسبت داد که اکثریت ژن‌های موجود در خوشه به آن تعلق دارند. از کل ۱۱۳ ژن کاندیدا، ۱۲ ژن شناسایی شده با غنی‌سازی GO و ۳۸ ژن مربوط به تجزیه و تحلیل شبکه، به مسیرهای زیستی مرتبط نسبت داده شدند. تجزیه و تحلیل شبکه علاوه بر این ۳۸ ژن کاندیدای بازیابی شده، ۲۸ ژن اتصال‌دهنده را نیز شناسایی کرد. این ژن‌ها تفاوت بیانی معنی‌داری در پاسخ به تنش شوری نداشتند، اما متعلق به همان خوشه‌هایی بودند که ژن‌های کاندیدا حضور داشتند و این موضوع نشان می‌دهد که آن‌ها نیز می‌توانند در سازوکار تحمل شوری نقش داشته باشند.

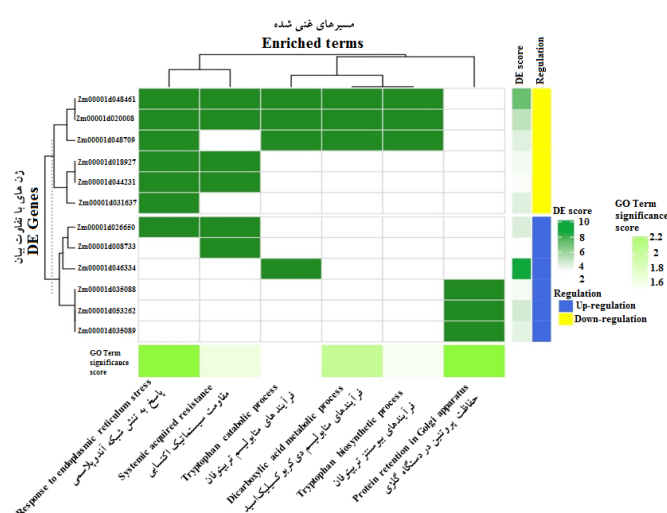
خوشه‌های فرعی نشان‌دهنده مسیرهایی هستند که می‌توانند تفاوت رفتار بیانی دو ژنوتیپ مورد مطالعه را توجیه کنند. شش خوشه با اندازه‌های متفاوت که ژن‌های کاندیدا را به هم ارتباط می‌دهند، شناسایی شدند (شکل ۳). خوشه اول (خوشه ۱) ژن‌های بیشتری را در بر

رشد مختلف با ۲۷۴ نمونه استفاده شد. هشت نمونه RNA-seq حاصل از تحقیق حاضر نیز به مجموعه بیانی ذکر شده اضافه شد و شبکه هم‌بیانی مطابق دستور ساخته شد. برای محاسبه همبستگی پیرسون بین بردارهای بیانی دو ژن از لگاریتم مقادیر FPKM استفاده شد.

در تجزیه و تحلیل شبکه، از وزن یال‌ها در جستجوی خوشه‌ها استفاده می‌شود. برای وزن‌دار کردن یال‌ها، از الگوریتم Random Walk با راه‌اندازی مجدد (RWR: Random Walk with Restart) (راه‌اندازی مجدد = ۰/۰۵) استفاده شد. استخراج خوشه‌ها از شبکه برهمکنش وزن‌دار شده با استفاده از برنامه "PheNetic" (De Maeyer *et al.*, 2013) و شناسایی بن‌مایه (موتیف) *de novo* با استفاده از برنامه MEME انجام شد (Bailey *et al.*, 2015). نواحی هزار نوکلئوتید بالادست رونویسی هر ژن به‌عنوان نواحی راه‌انداز تعریف شد (Rombauts *et al.*, 2003). توالی‌های راه‌انداز برای بن‌مایه‌هایی (موتیف‌هایی) با عرض ۶ تا ۱۵ تنها با در نظر گرفتن توالی رشته مثبت جستجو شد.

نتایج و بحث

برای شناسایی تفاوت‌های مولکولی بین ژنوتیپ‌های ذرت متحمل (T9) و حساس (S46) به شوری، پروفایل بیانی گیاهان متعلق به این دو ژنوتیپ در شرایط بدون تنش و تنش شوری با استفاده از دو تکرار زیستی مقایسه شد. در مجموع، فهرست ژن‌های کاندیدای شناسایی شده شامل ۱۱۳ ژن بود که به‌طور بالقوه می‌توانند در پاسخ اختصاصی ژنوتیپ متحمل دخیل باشند. تجزیه و تحلیل GO نشان داد که این ژن‌ها به‌طور معنی‌داری در فرایندهای زیستی پاسخ به تنش شبکه آندوپلاسمی (ER)، "مقاومت سیستماتیک اکتسابی"، "متابولیسم تریپتوفان"، "متابولیسم دی‌کربوکسیلیک‌اسید" و "حفاظت پروتئین در دستگاه گلژی" مشارکت دارند (شکل ۲). برخی از این مسیرهای شناسایی شده نقش قابل توجهی را در تنش



شکل ۲- تجزیه و تحلیل GO برای ژن‌های کاندیدا. مسیرهای زیستی و ژن‌های کاندیدا به ترتیب در محور x و محور y نشان داده شده‌اند.

جعبه‌های رنگ سبز نشان می‌دهد که ژن مربوطه در مسیر زیستی مربوطه دخالت دارد. مقیاس DE نشان‌دهنده درجه افتراق بیان ژن کاندیدا (Log fold change) می‌باشد. رنگ‌های زرد و آبی نشان می‌دهند که میزان بیان ژن مربوطه در شرایط تنش شوری در ژنوتیپ ذرت S46 (حساس) نسبت به ژنوتیپ متحمل T9 (متحمل) (پس از تصحیح تفاوت بیان در شرایط بدون تنش)، افزایش (آبی) یا کاهش (زرد) نشان داده است.

Fig. 2. GO enrichment analysis for the candidate genes. The overrepresented GO term and the candidate genes are shown on the x-axis and y-axis, respectively.

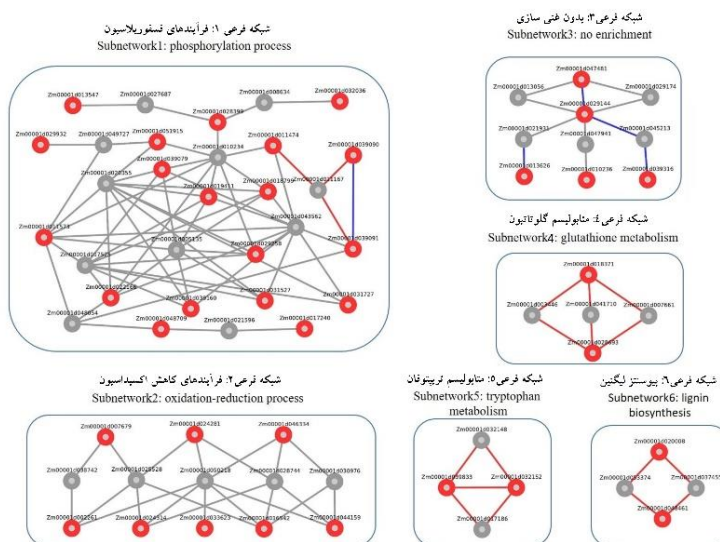
The green boxes indicate the presence of the corresponding gene in the GO class. The DE score reflects the degree of differentiation of candidate gene expression (log fold change). Blue and yellow colors indicate whether the gene was up-regulated (blue) or down-regulated (yellow) under salinity stress in S46 (sensitive) compared to T9 (tolerant) maize genotype (after correcting for differences in expression under normal conditions).

نشده است که دلیل آن می‌تواند نسبت کم یال‌های تنظیمی در شبکه ساخته شده بوده و کمبود اطلاعات تنظیمی در این نتایج نیز احساس می‌شود. با توجه به اینکه ۱۳ ژن موجود در خوشه اول در فرآیندهای مرتبط با "فسفوریلایسون" (FDR: 6.6e-6) مشارکت دارند، به نظر می‌رسد که فسفوریلایسون نقش قابل توجهی در تحمل به تنش شوری داشته باشد. هموستازی پتاسیم در سلول به عنوان یکی از عوامل اصلی تحمل به شوری شناخته شده است (Munns and Tester, 2008). تنش شوری سیستم حساسیت به شوری بالا (SOS) را برای حفظ هموستازی یونی فعال می‌کند. سیستم SOS پیام تنش شوری را از طریق افزایش محتوای کلسیم سیتوزولی آزاد دریافت می‌کند (Knight *et al.*, 1997). پیام‌رسانی

می‌گیرد و بالاترین یال را بین گره‌های موجود در این خوشه داشت. خوشه‌های ۱ و ۲ بیشتر شامل برهمکنش پروتئینی بودند و خوشه‌های ۳ تا ۵ فقط دارای برهمکنش متابولیکی بودند. این موضوع نشان می‌دهد که هر لایه مولکولی در شبکه برهمکنش، اطلاعات منحصر به فردی را داشته و همپوشانی کمی بین لایه‌های مولکولی مختلف در شبکه وجود دارد. این موضوع در نتایج سایر مطالعات نیز مشاهده شده است (Fukushima *et al.*, 2009). نکته قابل توجه حضور کم تعداد یال‌های هم‌بیانی در خوشه‌ها برای برقراری ارتباط بین ژن‌های کاندیدا است که نشان می‌دهد افزودن یال‌های هم‌بیانی نقش ناچیزی در نتایج داشته است. هیچ یال تنظیمی برای ارتباط ژن‌های کاندیدا در خوشه‌های حاصله استفاده

نشان می‌دهد که در شرایط تنش شوری، آبشارهای تنظیمی فسفوریلاسیون به حفظ هموستازی و جذب بهتر پتاسیم در ژنوتیپ متحمل (T9) کمک می‌کنند. تجزیه و تحلیل شبکه علاوه بر خوشه غنی از فعالیت فسفوریلاسیون، باعث شناسایی چندین خوشه غنی دیگر مرتبط با مسیرها و فرآیندهای مرتبط با تنش شوری شد (انتقال یون، اکسیداسیون، گلوکوتایون و متابولیسم تریپتوفان) (Serrano and Rodriguez-Navarro, 2001). ژن‌های Zm00001d017525 و Zm00001d020355 در مسیر "پیام‌رسانی پروتئین کیناز فعال‌شده با تنش" نقش دارند. با توجه به نتایج و با توجه به اینکه خوشه اول بیشتر شامل برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین است، می‌توان تفاوت در سازوکار تحمل تنش شوری بین ژنوتیپ متحمل (T9) و حساس (S46) را به تغییرات پس از ترجمه پروتئین و پیام‌رسانی به‌واسطه پروتئین ارتباط داد.

کلسیم باعث فعال شدن کینازها و سپس آبشارهای فسفوریلاسیون متوالی شده و باعث تنظیم بیان ژن در پاسخ به تنش شوری می‌شود. نتایج نشان داد که در خوشه اول در کنار ژن‌هایی که تحت تنش شوری افتراق بیان داشته (Zm00001d051915, Zm00001d018799, Zm00001d029258, Zm00001d011573, Zm00001d019411, Zm00001d022166) و در فرآیندهای مرتبط با فسفوریلاسیون دخالت دارند، چندین ژن (Zm00001d010234, Zm00001d020355, Zm00001d043562, Zm00001d005135, Zm00001d017525) بازیابی شدند که آن‌ها نیز در فرآیندهای مرتبط با فسفوریلاسیون درگیر هستند (شکل ۳). این ژن‌ها، تفاوت بیان معنی‌داری در مقایسه دو ژنوتیپ ذرت نداشتند، اما به دلیل ارتباط بالای آن‌ها با ژن‌های کاندیدا، به‌عنوان ژن‌های "اتصال‌دهنده" (Linker) در نتایج شبکه مورد توجه قرار گرفتند (شکل ۳، خوشه ۱، گره‌های خاکستری). این موضوع



شکل ۳- نتایج تجزیه و تحلیل شبکه در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به تنش شوری ذرت

گره‌های قرمز نمایانگر ژن‌های کاندیدا به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل ترنسکرپتوم می‌باشند. گره‌های خاکستری تفاوت بیان معنی‌داری در مقایسه دو ژنوتیپ نداشتند، اما توسط تجزیه و تحلیل شبکه به‌عنوان ژن‌های اتصال‌دهنده (ژن‌های مورد نیاز برای ارتباط ژن‌های کاندیدا) بازیابی شدند. رنگ یال‌ها: قرمز نشان‌دهنده برهمکنش متابولیک، خاکستری نشان‌دهنده برهمکنش پروتئین-پروتئین، و رنگ آبی نشان‌دهنده برهمکنش مشتق شده از شبکه هم‌بیانی هستند. هیچ برهمکنش تنظیمی در خوشه‌ها مشاهده نشد.

Fig. 3. Results of the network analysis of tolerant and sensitive maize genotypes

Red nodes represent candidate genes obtained from the transcriptome analysis. Grey nodes did not show a significant difference in gene expression between two genotypes, but were recovered by the network analysis as connector genes (genes required for connection of the candidate genes). Edge colors; Red: metabolic interaction, grey: protein-protein interaction, and blue: co-expression derived interaction. No regulatory interactions were recovered in any of the sub-networks.

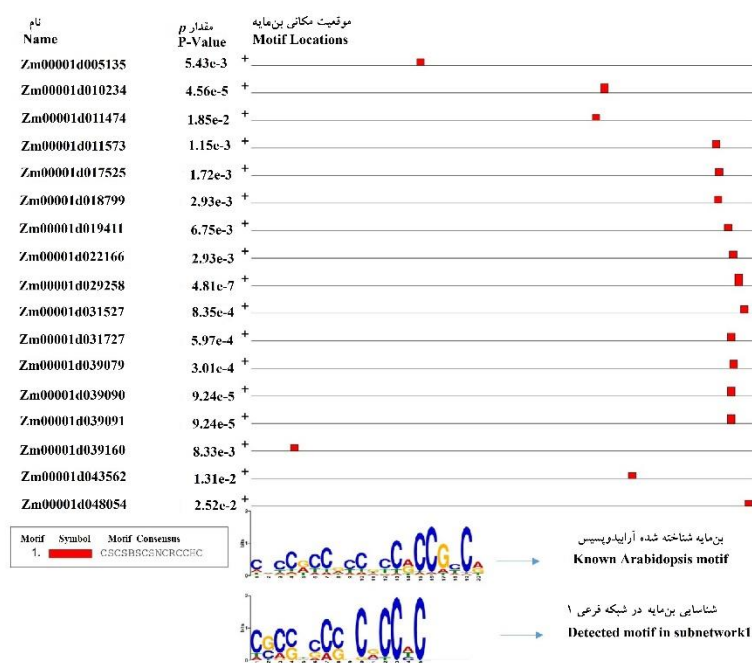
وجود دارد (Zm00001d011474, Zm00001d039091) و Zm00001d039090). نتایج مطالعات قبلی نشان داده است که فعالیت ژن‌های دارای فعالیت GTPase در همئوستازی یون، به‌ویژه برای حفظ همئوستازی یون‌های سدیم و پتاسیم در شرایط تنش شوری ضروری است (Ngara *et al.*, 2012). به‌عنوان نمونه، افزایش بیان یکی از ژن‌ها با فعالیت GTPase (PtRabE1b)، باعث تحمل به شوری در صنوبر شد (Zhang *et al.*, 2018).

در نتایج تحلیل شبکه، پنج خوشه حاوی ژن‌های کانیدیدا به همراه ژن‌های اتصال‌دهنده شناسایی شدند. این خوشه‌ها به احتمال زیاد منعکس‌کننده فرآیندهای دخیل در تحمل تنش شوری هستند. با توجه به نقش مشابه ژن‌های موجود در این خوشه‌ها در طول تنش شوری، فرض شد که این ژن‌ها تحت کنترل سازوکار رونویسی مشابهی در پاسخ به تنش شوری تنظیم شوند. با توجه به کمبود اطلاعات تنظیمی و تعداد کم یال‌های تنظیمی در شبکه برهمکنش، سازوکار تنظیم رونویسی ژن‌های کانیدیدا از طریق تجزیه و تحلیل شبکه بازبایی نشد، بنابراین از روش جستجوی *de novo* بن‌مایه (موتیف) برای بازبایی این سازوکار تنظیمی استفاده شد. به همین جهت بزرگ‌ترین خوشه (خوشه ۱) که حاوی ژن‌های دخیل در فعالیت فسفوریلاسیون و کینازی است، انتخاب شد. با فرض اینکه ژن‌های این خوشه توسط عامل رونویسی یکسانی تنظیم می‌شوند، ناحیه راه‌انداز این ژن‌ها برای یافتن بن‌مایه محافظت‌شده جستجو شد. با توجه به اینکه شناسایی *de novo* بن‌مایه مستعد خطای نوع اول بالا است، از خوشه ۱، گره‌هایی (ژن‌هایی) که تنها یک یال مشترک با یک گره دیگر داشتند، برای جستجوی بن‌مایه در نظر گرفته نشدند. ناحیه بالادستی شروع رونویسی (TSS) برای جستجوی بن‌مایه انتخاب شد. برای مواردی که ژن روی رشته منفی قرار گرفته باشد، مکمل معکوس توالی در نظر گرفته شد. یک بن‌مایه حفاظت‌شده در ناحیه راه‌انداز

ژن‌های خوشه دوم به‌صورت معنی‌داری در فرآیندهای مرتبط با "کاهش اکسیداسیون" مشارکت دارند، بنابراین ژن‌های کانیدیدا در این خوشه در همئوستازی و تنظیم گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در طول تنش شوری دخالت دارند که این یافته با نتایج سایر محققان سازگار است (Singh *et al.*, 2013). بازبایی فرآیندهای مربوط به "اکسیداسیون"، با نتایج تحقیقات قبلی مبنی بر اینکه ژنوتیپ‌های متحمل به شوری با تنظیم سازوکارهای دفاعی آنتی‌اکسیدانی، واکنش‌های مناسبی در برابر مولکول‌های ROS نشان می‌دهند (Sairam and Tyagi, 2004) مطابقت دارد. ROSها در کنار اثرات منفی به‌عنوان مولکول‌های دریافت پیام برای تحریک آبشارهایی از مسیرهای پیام‌رسانی عمل می‌کنند که منجر به درک و فعال شدن پاسخ‌های متناسب و به‌موقع به تنش شوری می‌شود (Choudhury *et al.*, 2013). ژن‌های کانیدیدا در این خوشه (گره‌های قرمز) ارتباط مستقیم ندارند، بلکه از طریق چند ژن اتصال‌دهنده متصل می‌شوند (شکل ۳، شبکه فرعی ۲). خوشه‌های کوچک‌تر (۴، ۵، ۶) به ترتیب در متابولیسم "گلوکاتیون"، "بیوستنز تریپتوفان" و "بیوستنز لیگنین" مشارکت دارند. اهمیت و نقش این مسیرهای زیستی در تنش شوری در مطالعات قبلی آشکار شده است. گزارش شده است که گلوکاتیون گیاه را در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش شوری محافظت می‌کند (Nazar *et al.*, 2015). از طرف دیگر، تریپتوفان پیش‌ساز اصلی ایندول استیک اسید (IAA) و پیش‌ساز چندین املاح سازگار است که در همئوستازی یونی و اسمزی در شرایط تنش شوری دخیل هستند (Zahir *et al.*, 2010). به‌علاوه تنظیم بیوستنز لیگنین به‌عنوان عامل اصلی افزایش تحمل تنش شوری در گیاهان شناسایی شده است (Liu *et al.*, 2018). ژن‌های انتقال‌دهنده (Transporter) با نقش شناخته شده در همئوستازی یون در خوشه‌های ۱ و ۳ شناسایی شدند که در میان آن‌ها ژن‌هایی با فعالیت GTPase

در پاسخ به تنش شوری افتراق بیان نشان داده است (Ma *et al.*, 2006). FUF1 دارای یک همولوگ منحصر به فرد در ذرت به نام Zm00001d048991 بوده و مانند آراییدوپسیس، بیان آن منحصر به بافت است و بیشتر در ریشه بیان می‌شود (Walley *et al.*, 2016). تنوع ژنتیکی در این عامل رونویسی می‌تواند بخشی از تفاوت‌های پاسخ به تنش شوری بین ژنوتیپ‌های متحمل و حساس را توجیه کند که می‌تواند هدف مناسبی برای برنامه‌های به‌نژادی باشد.

ژن‌های انتخاب شده خوشه اول یافت شد. این بن‌مایه در ۱۷ سکانس از ۲۱ دنباله در نظر گرفته شده قرار داشته و در اکثر توالی‌ها موقعیت مکانی بن‌مایه بسیار نزدیک به TSS است (شکل ۴). بن‌مایه شناسایی شده شباهت بسیار بالایی با یک بن‌مایه شناخته شده در گیاه آراییدوپسیس دارد که محل اتصال عامل رونویسی DREB A-4 از عامل رونویسی ERF/AP2 است که بیان آن در ریشه گیاه آراییدوپسیس به‌طور معنی‌داری



شکل ۴- بن‌مایه (موتیف) محافظت شده شناسایی شده در توالی راه‌انداز ژن‌های موجود در خوشه اول در ژنوتیپ‌های ذرت موقعیت مکانی بن‌مایه شناسایی شده متمایل به ناحیه بالادستی شروع رونویسی (TSS) بوده و شباهت زیادی با بن‌مایه شناسایی شده در گیاه آراییدوپسیس که محل اتصال عامل رونویسی FuF1 (Q-value 2.32e-04) است، دارد. لوگوی اول بن‌مایه آراییدوپسیس است که از داده DAP-seq بدست آمده و لوگوی دوم نشان‌دهنده بن‌مایه *de novo* شناسایی شده در خوشه اول می‌باشد

Fig. 4. The protected motif overrepresented in the promoter sequences of the genes in sub-network 1 in maize genotypes. The identified motif shows a strong bias towards upstream of the transcription start site (TSS) and is very similar to the known Arabidopsis motif representative for FuF1 transcription factor binding site (q-value 2.32e-04). The first logo is the Arabidopsis motif obtained from DAP-seq data and the second one represents the *de novo* motif identified in sub-network 1

می‌دهد که می‌تواند در ارتباط بین تنظیم در سطح رونویسی و بعد از رونویسی در تحمل به شوری نقش داشته باشد. داده‌های RNA-seq تولید شده در پایگاه اطلاعاتی

نتیجه‌گیری

تجزیه و تحلیل مبتنی بر شبکه در دو ژنوتیپ ذرت، مسیرهای مولکولی مرتبط با تفاوت در تحمل به شوری را شناسایی کرد و یک بن‌مایه و عامل رونویسی را نشان

Dr. Muhammad و Agricultural University, China
COMSATS University Islamabd, Pakistan از Sajjad
جهت فراهم کردن امکان انجام توالی‌یابی RNA
و از آقای دکتر رزگار سید رحمانی از
Department of Plant Biotechnology and Bioinformatics, Ghent
University, Ghent, Belgium جهت کمک در تجزیه
داده‌ها، تشکر و قدردانی می‌شود.

NCBI بایگانی توالی (SRA) با کد شناسایی
SRP273987 قابل دسترس هستند.

سپاسگزاری

از دانشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست‌فناوری
دانشگاه ارومیه جهت فراهم کردن امکانات لازم
برای انجام این پژوهش، از Dr. Jiajie Wu از Shandong

References

منابع مورد استفاده

- Abdelaal, K. A., L. M. EL-Maghraby, H. Elansary, Y. M. Hafez, E. I. Ibrahim, M. El-Banna and A. Elkelish. 2020.** Treatment of sweet pepper with stress tolerance-inducing compounds alleviates salinity stress oxidative damage by mediating the physio-biochemical activities and antioxidant systems. *Agronomy*. 10(1): 26. <https://doi.org/10.3390/agronomy10010026>.
- Amirbakhtiar, N., A. Ismaili, M. R. Ghaffari, F. Nazarian Firouzabadi and Z. S. Shobbar. 2019.** Transcriptome response of roots to salt stress in a salinity-tolerant bread wheat cultivar. *PLOS ONE*. 14(3): e0213305.
- Bailey, T. L., J. Johnson, C.E. Grant and W. S. Noble. 2015.** The MEME Suite. *Nucleic Acids Res.* 43(W1): W39-W49.
- Bolger, A. M., M. Lohse and B. Usadel. 2014.** Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 30(15): 2114-2120.
- Choudhury, S., P. Panda, L. Sahoo and S. K. Panda. 2013.** Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signal. Behavior*. 8(4): e23681.
- Das, K. and A. Roychoudhury. 2014.** Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers Environ. Sci.* 2(53): 1-13.
- De Maeyer, D., J. Renkens, L. Cloots, L. De Raedt and K. Marchal. 2013.** PheNetic: network-based interpretation of unstructured gene lists in *E. coli*. *Mol. Biosys.* 9(7): 1594-1603.
- Fukushima, A., M. Kusano, H. Redestig, M. Arita and K. Saito. 2009.** Integrated omics approaches in plant systems biology. *Cur. Opinion Chem. Biol.* 13(5-6): 532-538.
- García-Ortega, L. F. and O. Martínez. 2015.** How many genes are expressed in a transcriptome estimation and results for RNA-Seq. *PLOS ONE*. 10(6): e0130262.
- Jiang, Y., Y. Liang, D. Wang, D. Xu and T. Joshi. 2020.** A dynamic programming approach to integrate gene expression data and network information for pathway model generation. *Bioinformatics*. 36(1): 169-176.
- Hussain, S., M. Shaukat, M. Ashraf, C. Zhu, Q. Jin and J. Zhang. 2019.** Salinity stress in arid and semi-arid climates: Effects and management in field crops. *In: Climate Change and Agriculture*, Hussain, S. (Ed.),

IntechOpen: London, UK.

- Kim, D., J. M. Paggi, C. Park, C. Bennett and S. L. Salzberg. 2019.** Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Natur. Biotechnol.* 37(8): 907-915.
- Knight, H., A. J. Trewavas and M. R. Knight. 1997.** Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J.* 12(5): 1067-1078.
- Li, H., D. Li, A. Chen, H. Tang, J. Li and S. Huang. 2017.** RNA-seq for comparative transcript profiling of kenaf under salinity stress. *J. Plant Res.* 130: 365-372.
- Li, X., W. Li, M. Zeng, R. Zheng and M. Li. 2020.** Network-based methods for predicting essential genes or proteins: a survey. *Brief Bioinform.* 21(2): 566-583.
- Liu, Q., L. Luo and L. Zheng. 2018.** Lignins: biosynthesis and biological functions in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 19(2): 335.
- Ma, S., Q. Gong and H. J. Bohnert. 2006.** Dissecting salt stress pathways. *J. Exp. Bot.* 57(5): 1097-1107.
- Munns, R. and M. Tester. 2008.** Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651-681.
- Naseem, S., Q. Ali and A. Malik. 2020.** Evaluation of maize seedling traits under salt stress. *Biol. Clinical Sci. Res. J.* 1: 25. doi: 10.54112/bcsrj.v2020i1.25.
- Nawaz, A., A. Haseeb, H. Malik, Q. Ali and A. Malik. 2020.** Genetic association among morphological traits of *Zea mays* seedlings under salt stress. *Biol. Clinical Sci. Res. J.* (1): 21. doi: 10.54112/bcsrj.v2020i1.21.
- Nazar, R., S. Umar and N.A. Khan. 2015.** Exogenous salicylic acid improves photosynthesis and growth through increase in ascorbate-glutathione metabolism and S assimilation in mustard under salt stress. *Plant Signal. Behavior*, 10(3): e1003751.
- Ngara, R., R. Ndimba, J. Borch-Jensen, O.N. Jensen and B. Ndimba. 2012.** Identification and profiling of salinity stress-responsive proteins in *Sorghum bicolor* seedlings. *J. Proteom.* 75(13): 4139-4150.
- Rombauts, S., K. Florquin, M. Lescot, K. Marchal, P. Rouzé and Y. Van de Peer. 2003.** Computational approaches to identify promoters and cis-regulatory elements in plant genomes. *Plant Physiol.* 132(3): 1162-1176.
- Sairam, R. K. and A. Tyagi. 2004.** Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Cur. Sci.* 86(3): 407-421.
- Serrano, R. and A. Rodriguez-Navarro. 2001.** Ion homeostasis during salt stress in plants. *Cur. Opinion Cell Biol.* 13(4): 399-404.
- Singh, P. K., R. Singh and S. Singh. 2013.** Cinnamic acid induced changes in reactive oxygen species scavenging enzymes and protein profile in maize (*Zea mays* L.) plants grown under salt stress. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 19(1): 53-59.
- Suravajhala, P., L. J. A. Kogelman and H. N. Kadarmideen. 2016.** Multi-omic data integration and analysis using systems genomics approaches: methods and applications in animal production, health and welfare. *Genet. Select. Evol.* 48(1): 38. doi 10.1186/s12711-016-0217-x.

- Van den Broeck, L., M. Dubois, M. Vermeersch, V. Storme, M. Matsui and D. Inzé. 2017.** From network to phenotype: the dynamic wiring of an Arabidopsis transcriptional network induced by osmotic stress. *Mol. Sys. Biol.* 13(12): 961.
- Virilouvet, L., T. J. Avenson, Q. Du, C. Zhang, N. Liu, M. Fromm, Z. Avramova and S.E. Russo. 2018.** Dehydration stress memory: gene networks linked to physiological responses during repeated stresses of *Zea mays*. *Frontiers Plant Sci.* 9: 1058. doi 10.3389/fpls.2018.01058.
- Walley, J. W., R. C. Sartor, Z. Shen, R.J. Schmitz, K.J. Wu, M. A. Urich and S. P. Briggs. 2016.** Integration of omic networks in a developmental atlas of maize. *Science.* 353(6301): 814-818.
- Wang, Z., M. Gerstien and M. Snyder. 2009.** RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Natur. Rev. Genet.* 10: 57-63.
- Woldesemayat, A. A. and M. Ntwasa. 2018.** Pathways and network based analysis of candidate genes to reveal cross-talk and specificity in the sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) responses to drought and it's co-occurring stresses. *Frontiers Genet.* 9:557.
- Zahir, Z. A., M. K. Shah, M. Naveed and M. J. Akhter. 2010.** Substrate-dependent auxin production by *Rhizobium phaseoli* improves the growth and yield of *Vigna radiata* L. under salt stress conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(9): 1288-1294.
- Zhang, J. D. and S. Wiemann. 2009.** KEGGgraph: a graph approach to KEGG PATHWAY in R and bioconductor. *Bioinformatics.* 25(11): 1470-1471.
- Zhang, J., Y. Li, B. Liu, L. Wang, L. Zhang, J. Hu, J. Chen, H. Zheng and M. Lu. 2018.** Characterization of the *Populus Rab* family genes and the function of PtRabE1b in salt tolerance. *BMC Plant Biol.* 18(1): 1-15.
- Zhou, Y., P. Yang, F. Cui, F. Zhang, X. Luo and J. Xie. 2016.** Transcriptome analysis of salt stress responsiveness in the seedlings of dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). *PLOS ONE.* 11(1): e0146242.

Network-based transcriptome analysis in salt tolerant and salt sensitive maize (*Zea mays* L.) genotypes

Mohasseli, T.¹, S. Dezhsetan ² and R. Darvishzadeh ³

ABSTRACT

Mohasseli, T., S. Dezhsetan and R. Darvishzadeh. 2022. Network-based transcriptome analysis in salt tolerant and salt sensitive maize (*Zea mays* L.) genotypes. *Iranian Journal of Crop Sciences*. 24(1): 79-92. (In Persian).

Identification of genes involved in salinity stress tolerance provides deeper insight into molecular mechanisms underlying salinity tolerance in maize. The present study was conducted in the faculty of agriculture of Urmia university, Iran, in 2018, with the aim of identifying genetic differences between two maize genotypes in tolerance to salinity stress, and the results of gene expression were integrated with gene interaction networks. First, two maize genotypes with extreme phenotypic differences in salinity tolerance were identified using phenotypic screening data. Gene expression was studied by RNA-sequencing to unveil molecular mechanisms underlying salinity tolerance differences in two selected maize genotypes (T9: salinity-tolerant; S46: salinity-sensitive). Phosphorylation-dependent signaling processes, ion transportation, oxidation-reduction, glutathione metabolism, and tryptophan metabolism between tolerant and sensitive genotypes were identified as different biological pathways by gene ontology and interaction network analysis on the genes with differential expression. Network analysis identified a motif as a common regulatory element (*cis*-regulatory element) in the promoter region of genes belonging to the sub-network with phosphorylation and kinase activity. This motif corresponds to a regulatory element known in *Arabidopsis* which binds a transcription factor with a known role in responding to salinity-stress. By integrating gene expression and interaction network data obtained from different molecular layers, pathways and genes distinguishing in two salinity-tolerant and salinity-sensitive genotypes were identified, These findings can be used in maize breeding and biotechnology programs to improve maize grain yield under salinity stress conditions.

Key words: Gene interaction network, Maize, Motif, RNA-sequencing, Salinity stress and Transcription factor

Received: December, 2021 Accepted: February, 2022

1. PhD Student, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2. Associate Prof., University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran (Corresponding author) (Email: sdezhsetan@uma.ac.ir)

3. Professor, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding author) (Email: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir)