

DOI: 20.1001.1.15625540.1401.24.1.6.7

## تجزیه و تحلیل تنسکرپتوم با رهیافت شبکه در ژنوتیپ‌های متتحمل و حساس به تنفس شوری (*Zea mays L.*) ذرت

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

طاهر محصلی<sup>۱</sup>، سارا دژستان<sup>۲</sup>، رضا درویش زاده<sup>۳</sup>

### چکیده

محصلی، ط.، س. دژستان و ر. درویش زاده. ۱۴۰۱. تجزیه و تحلیل تنسکرپتوم با رهیافت شبکه در ژنوتیپ‌های متتحمل و حساس به تنفس شوری ذرت انجام و نتایج بیان ژن با شبکه‌های برهمکنش ژنی ادغام شد. ابتدا با استفاده از غربالگری فنوتیپی دو ژنوتیپ با تفاوت‌های فنوتیپی بازد در تحمل به تنفس شوری شناسایی شدند. برای دو ژنوتیپ منتخب (T9: متتحمل به تنفس شوری؛ S46: حساس به تنفس شوری)، بیان ژن‌ها با کمک توالی‌بایی RNA برای آشکارسازی سازوکارهای مولکولی زمینه‌ساز تفاوت در تحمل به تنفس شوری مطالعه شد. با هسته‌شناسی 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 گلوتاتیون و تریپتوفان بین ژنوتیپ‌های متتحمل و حساس شناسایی شدند. در نتایج آنالیز شبکه، در ناحیه راه‌انداز ژن‌های متعلق به خوش با فعالیت فسفوریلاسیون و کینازی، یک بن‌ماهیه (موتیف) به عنوان عنصر تنظیمی (Cis-regulatory element) مشترک یافت شد. این بن‌ماهیه با یک عنصر تنظیمی شناخته شده در گیاه آراییدوپسیس که محل اتصال یک فاکتور رونویسی با نقش شناخته شده در پاسخ به تنفس شوری است، مطابقت داشت. با ادغام آداده‌های بیان ژن و شبکه برهمکنش، مسیرهای ژن‌های متمايز‌کننده که در دو ژنوتیپ متتحمل و حساس به تنفس شوری شناسایی شدند؛ می‌توان در برنامه‌های بهنژادی و بیوتکنولوژی برای بهبود عملکرد ذرت تحت تنفس شوری استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: بن‌ماهیه (موتیف)، تنفس شوری، توالی‌بایی 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 T.T.94/۱۰۱ 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: sdezhsetan@uma.ac.ir)

۳- استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir)

ژو و همکاران (Zhou *et al.*, 2016) برای شناسایی سازوکارهای ژنتیکی-مولکولی دخیل در تحمل تنش شوری در برنج وحشی (*Oryza rufipogon*)، از پلتفرم Illumina HiSeq 2000 جهت تجزیه و تحلیل الگوی ییان رونوشت ژن‌ها در برگ و ریشه گیاهچه‌ها 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 ژن‌هایی که به صورت افتراقی بیان شده بودند، عوامل رونویسی مانند NAC و MYB شناسایی شدند که نشان‌دهنده دخیل بودن شبکه‌های تنظیمی چند بُعدی در تنش شوری هستند. به علاوه تعداد دیگری از ژن‌ها مانند ZFP179, ZFP182 و ZFP252 در پاسخ به تنش شوری شناسایی و گزارش شدند. تجزیه و تحلیل ترانسکریپtom، ژن‌هایی را شناسایی می‌کند که میزان بیان آن‌ها در مقایسه بین شرایط و یا ژنتیپ‌های مختلف به طور قابل توجهی تغییر نشان می‌دهند. اگرچه مطالعه ترانسکریپtom برای شناسایی فرآیندهای زیستی که تحت شرایط مورد مطالعه فعال یا مهار می‌شوند کارآمد است، اما سازوکارهای بالادستی که تغییرات پایین‌دستی مشاهده شده را به صورت سیستمی تنظیم می‌کنند، اغلب ناشناخته باقی مانده‌اند (Li *et al.*, 2020). علاوه بر این، از لحاظ آماری تجزیه و تحلیل ترانسکریپtom با خطای نوع یک (نتایج مثبت کاذب) و خطای نوع دوم (نتایج منفی کاذب) همراه می‌باشد. این موضوع از یک سو باعث شناسایی ژن‌هایی می‌شود که در واقع در فرآیند مورد مطالعه در گیر نیستند (خطای نوع یک) و از سوی دیگر ژن‌های واقعی در گیر که در سطح بیانی تنظیم نمی‌شوند و یا تغییرات بیان بسیار نامحسوس اما بسیار تأثیرگذار دارند، ناشناخته باقی می‌مانند (خطای نوع دوم) (García-Ortega and Martínez, 2015). با ادغام اطلاعات مولکولی در دسترس در قالب شبکه‌های برهمکنش مولکولی با داده‌های بیانی، می‌توان از اطلاعات موجود و نتایج مطالعات پیشین برای به حداقل

## مقدمه

ذرت (Zea mays L.) به عنوان یکی از مهم‌ترین 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 بی‌رویه انسان از منابع طبیعی و تغییرات شرایط آب و هوایی، انواع مختلفی از تنش‌های غیر زیستی را به دنبال داشته است. شوری یکی از انواع تنش‌های غیر زیستی و یکی از عوامل اصلی محدود کننده رشد و بهره‌وری محصولات کشاورزی، به ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک محسوب می‌شود (Abdelaal *et al.*, 2020). یکی از مهم‌ترین پیامدهای تنش شوری تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در گیاه است که به دنبال آن آسیب‌های اکسیداتیو ایجاد می‌شود. تخریب پروتئین‌ها، لیپیدها، رنگدانه‌ها و DNA اصلی‌ترین پیامدهای تنش اکسیداتیو هستند (Das and Roychoudhury, 2014).

با گسترش فناوری‌های توالی‌یابی با توان عملیاتی بالا، محققان روش جدیدی به نام توالی‌یابی RNA (RNA-seq) برای مقایسه الگوی ییان ژن‌ها و شناسایی ژن‌های مؤثر در تحمل شوری برای تشریح سازوکار مولکولی تحمل در گیاهان ارائه کرده‌اند (Li *et al.*, 2017). لی و همکاران (Wang *et al.*, 2009) الگوی رونویسی ژن‌ها 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 هستی‌شناسی ژن نشان داد که ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند پراکسیداز، گلوتاتیون ترانسفراز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون ردوكتاز هنگام اعمال تنش شوری در گیاه فعال شدند.

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

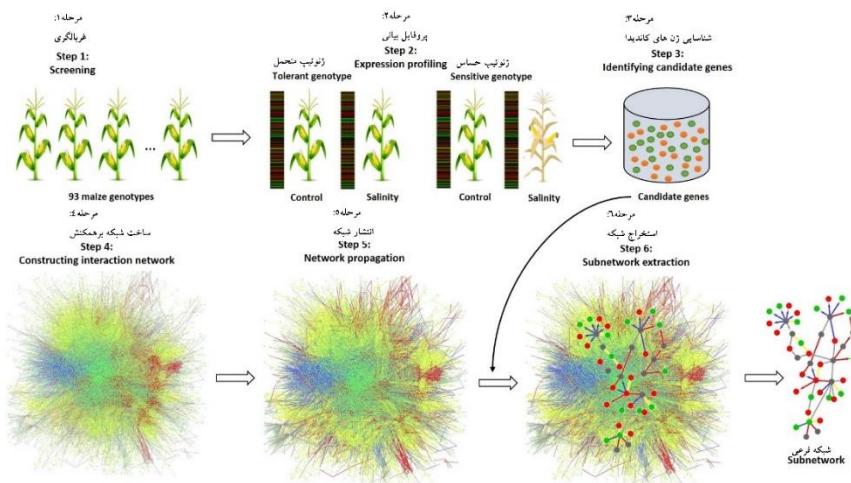
تحقیق حاضر با هدف شناسایی سازوکارهای مولکولی متمازیکننده دو ژنوتیپ ذرت از نظر تحمل به تنش شوری، با استفاده از تجزیه و تحلیل مبتنی بر شبکه انجام شد.

## 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 گلستانهای آزمایشی در شرایط مزرعه مورد ارزیابی قرار گرفتند. تجزیه تحمل به تنش شوری بر اساس صفات محتوای آب نسبی برگ (RWC)، نسبت پتانسیم 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 اتفاق کرشد در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار زیستی کشت شدند. کشت گیاهان به صورت نیمه-هیدرопونیک و در گلستانهای حاوی پرلیت و

رسانی خطای نوع اول و دوم استفاده کرد. تجزیه و تحلیل شبکه، روشهای کارآمد برای ادغام داده‌های تجربی حاصل از نتایج مطالعه سطوح مختلف مولکولی با کلیه اطلاعات مولکولی موجود می‌باشد (Suravajhala *et al.*, 2016). به عنوان 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 آبسزیک و انتقال پیام در گیر بوده و نقش کلیدی در بهبود تحمل به تنش در این گیاه ایفا می‌کند (Woldesemayat and Ntwasa, 2018). تجزیه و تحلیل شبکه هم‌بیانی در ذرت نیز برای شناسایی مازولهای (گروه‌های ژنی) هم‌بیان و تعیین اینکه چگونه با شاخص‌های فیزیولوژیکی مرتبط با تنش خشکی همبستگی دارند، استفاده شده است (Virlouvet *et al.*, 2018). در آزمایش دیگری در گیاه آرابیدوپسیس با استفاده از تجزیه و تحلیل شبکه، یک شبکه رونویسی کنترل کننده 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 قرارداد. در همین راستا خوش‌هایی از این شبکه برهمکنش که در آن‌ها بیشترین ارتباط بین ژن‌های کاندیدا برقرار است، به عنوان اصلی‌ترین فرایندهای بیولوژیکی در گیر استخراج می‌شوند (Jiang *et al.*, 2020).علاوه بر این، ژن‌های کاندیدایی که جزئی از هیچ کدام از خوش‌های شناسایی شده نباشد، به احتمال زیاد نقشی را در فرآیند مورد بررسی (برای این مطالعه تنش شوری) نداشته و از فهرست نتایج حذف خواهد شد. همچنین، ژن‌های در گیر در فرآیند مورد نظر که در سطح بیان،



**شکل ۱- بررسی ژن‌های کاندیدا حاصل از نتایج بیان ژن در شبکه برهmekش به منظور استخراج خوش‌های درگیر در تنفس شوری**

غربالگری فنتیپی: از ۹۳ ژنوتیپ ذرت، دو ژنوتیپ با رفتار فنتیپی بسیار متفاوت از نظر تنفس شوری (T9: متحمل، S46: حساس) انتخاب شدند. پروفایل بیان ژن‌های ژنوتیپ T9 و S46 در شرایط عادی و تنفس شوری مورد بررسی قرار گرفت. انتخاب ژن‌های کاندیدا: ژن‌هایی که بین دو ژنوتیپ به تنفس شوری واکنش متفاوتی داشتند، بدغونه ژن‌های کاندید (ژن‌های قرمز رنگ در سمت راست نقشه حرارتی) انتخاب شدند. تجزیه و تحلیل شبکه: شبکه برهmekش ادغامی از لایه‌های مختلف مولکولی تهیه شد (شبکه‌های تنظیمی، شبکه‌های برهmekش پروتئین-پروتئین، شبکه‌های متابولیکی و شبکه‌های هم‌بیان) و متعاقباً به یک شبکه برهmekش وزن‌دار تبدیل شد. ژن‌های کاندیدا بر روی این شبکه برهmekش وزن‌دار مورد بررسی قرار گرفتند. خوش‌های قرمز ژن‌های کاندیدا هستند که با بیان اختراقی 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 برهmekش 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.

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 تنفس) انجام شد. نمونه‌های زمان‌های نمونه‌برداری برای سطح بدون تنفس و برای سطح تنفس برای هر یک از ژنوتیپ‌های متتحمل و حساس در تکرارهای اول و دوم

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

شدن. برای شناسایی ژن‌های کاندیدا با استفاده از این مدل از بسته آماری edgeR استفاده شد. نقش زیستی maizegdb.org (GO annotation) هر ژن از سایت [maizegdb.org](http://maizegdb.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 B73-PPIM از نسخه قدیمی ژنوم مرچع (ژنوم مرچع-v3) استفاده شده است، شناسه ژن‌ها به شناسه ژنوم مرچع B73-v4 تبدیل شد. شبکه برهمکنش پروتئین بحسب آمده شامل ۱۰۸۶۸ گره (پروتئین) و ۱۵۷۹۳۴ برهمکنش به عنوان یال است. برهمکنش‌های متابولیکی ذرت از KEGG دریافت شد و با استفاده از (Zhang and Wiemann, 2009) KEGGgraph تبدیل شد که متشكل 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 شدن. 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 ییانی برگرفته از بافت‌ها و محیط‌های

باهم مخلوط و از آن‌ها برای استخراج RNA استفاده شد. استخراج RNA کل از هر نمونه با استفاده از محلول استخراج TM RNX-Plus (سیناکلون، ایران)، طبق توصیه شرکت سازنده انجام شد. پس از اطمینان از بالا بودن کمیت و کیفیت RNAهای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودرایپ و اسپکتروفوتومتر، نمونه‌های RNA جهت توالی یابی به شرکت Berry Genomics در چین ارسال شدند. در شرکت ذکرشده بعد از تهیه کتابخانه cDNA از نمونه‌های ارسالی، Illumina Novaseq 6000 با استفاده از دستگاه (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 بازماندهای آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) انجام شد. در ادامه خوانش‌های بحسب آمده با ژنوم مرچع هم ردیف شدند تا موقعیت مکانی خوانش‌ها روی ژنوم مرچع مشخص شود (Amirbakhtiar *et al.*, 2019). هم ردیفی خوانش‌ها با ژنوم مرچع (*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  $1/5 > \text{Fold-change}$  (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

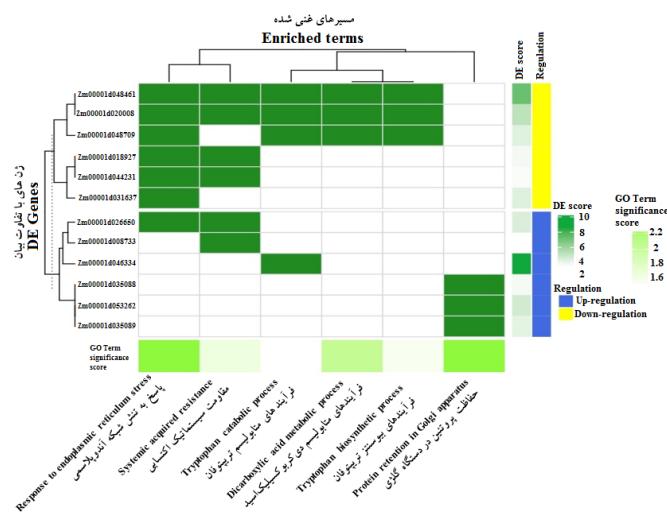
شوری دارند. با این حال، این نتایج تنها با پوشش دادن ۱۲ ژن کاندیدا حاصل شد (شکل ۲) و ۱۰۱ ژن دیگر به مسیرهای بیولوژیکی دیگری تعلق داشتند. این نتایج نشان می‌دهد که بخش قابل توجهی از سازوکار تحمل به شوری با تجزیه و تحلیل GO قابل شناسایی نمی‌باشد. برای درک بهتر سازوکارهای درگیر در تحمل به شوری که با ژن‌های کاندیدا میانجی گری 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 (De Maeyer *et al.*, 2013) مجدد = ۰/۰۵) استفاده شد. استخراج خوشه‌ها از شبکه "PheNetic" برهمکنش وزن‌دار شده با استفاده از برنامه "PheNetic" (Bailey *et al.*, 2015) و شناسایی بن‌مایه (موتیف) (MEME با استفاده از برنامه de novo (Rombauts *et al.*, 2003) نواحی هزار نوکلئوتید بالا دست رونویسی (موتیف‌هایی) با عرض ۶ تا ۱۵ تنهای 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 به طور بالقوه می‌توانند در پاسخ اختصاصی ژنوتیپ متحمل دخیل باشند. تجزیه و تحلیل GO نشان داد که این ژن‌ها به طور معنی‌داری در فرایندهای زیستی پاسخ به تنش شبکه آندوپلاسمی (ER)، "مقاومت سیستماتیک اکتسابی"، "متاپولیسیم تریپوفان"، "متاپولیسیم دی‌کربوکسیلیک اسید" و "حفاظت پروتئین در دستگاه گلری" 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.

جمعه‌های رنگ سبز نشان می‌دهد که ژن مربوطه در مسیر زیستی مربوطه در حالت دارد. مقیاس DE نشان‌دهنده درجه اختلاف بین ژن کاندیدا (Log fold change) می‌باشد. رنگ‌های زرد و آبی نشان می‌دهند که میزان بیان ژن مربوطه در ژنوتیپ ذرت ۴۶ (حساس) نسبت به ژنوتیپ متحمل ۹ (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.

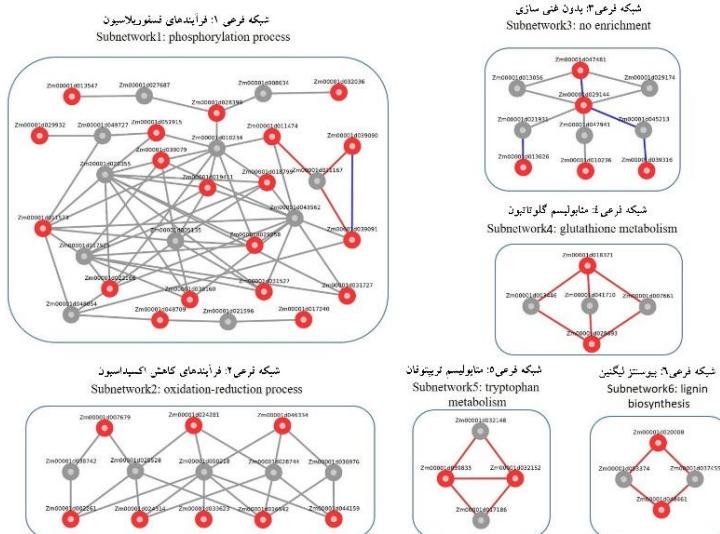
The green boxes indicate the presence of the corresponding gene in the GO class. The DE score reflects the degree of differentiation of candidate gene expression (log fold change). Blue and yellow colors indicate whether the gene was up-regulated (blue) or down-regulated (yellow) under salinity stress 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 خوش‌های اول در فرآیندهای مرتبط با "فسفوریل‌اسیون" (FDR:  $6.6 \times 10^{-6}$ ) مشارکت دارند، به نظر می‌رسد که فسفوریل‌اسیون نقش قابل توجهی در تحمل به تنش شوری داشته باشد. همئوستازی پتانسیم 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 همئوستازی یونی فعال می‌کند. سیستم SOS پیام تنش شوری را از طریق افزایش محتوای کلسیم سیتوزویی آزاد دریافت می‌کند (Knight *et al.*, 1997). پیام‌رسانی

می‌گیرد و بالاترین یال را بین گره‌های موجود در این خوش‌های ۱ و ۲ بیشتر شامل برهمکش پروتئینی بودند و خوش‌های ۳ تا ۵ فقط دارای برهمکش متابولیکی بودند. این موضوع نشان می‌دهد که هر لایه مولکولی در شبکه برهمکش، 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 همیانی در خوش‌های برای برقراری ارتباط بین ژن‌های کاندیدا است که نشان می‌دهد افزودن یال‌های همیانی نقش ناچیزی در نتایج داشته است. هیچ یال تنظیمی برای ارتباط ژن‌های کاندیدا در خوش‌های حاصله استفاده

نشان می‌دهد که در شرایط تنش شوری، آبشارهای تنظیمی فسفوریلاسیون به حفظ همئوستازی و جذب بهتر پتاسیم در ژنوتیپ متتحمل (T9) کمک می‌کنند. تجزیه و تحلیل شبکه علاوه بر خوش‌گزینی از فعالیت فسفوریلاسیون، باعث شناسایی چندین خوش‌گزینی دیگر مرتبط با مسیرها و فرآیندهای مرتبط با تنش شوری شد (انتقال یون، اکسیداسیون، گلوتاتیون و متابولیسم). (Serrano and Rodriguez-Navarro, 2001, Rodriguez-Navarro and Serrano, 2001) در ژن‌های Zm00001d017525 و Zm00001d020355 در مسیر "پیام‌رسانی پروتئین کیناز فعال شده با تنش" نقش دارند. با توجه به نتایج و با توجه به اینکه خوش‌گزینی اول بیشتر شامل برهمنکش‌های پروتئین-پروتئین است، می‌توان تفاوت در سازوکار تحمل تنش شوری بین ژنوتیپ متتحمل (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 خوش‌گزینی اول در کنار ژن‌هایی که تحت تنش شوری افتراق بیان داشته‌اند (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 در گیر هستند (شکل ۳). این ژن‌ها، تفاوت بیان معنی‌داری در مقایسه دو ژنوتیپ ذرت نداشتند، اما به دلیل ارتباط بالای آن‌ها با ژن‌های کاندیدا، به عنوان ژن‌های "اتصال‌دهنده" (Linker) در نتایج شبکه مورد توجه قرار گرفتند (شکل ۳، خوش‌گزینی ۱، گره‌های خاکستری). این موضوع



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

گره‌های قرمز نمایانگر ژن‌های کاندیدا به دست آمده از تجزیه و تحلیل تنسکرپتوم می‌باشد. گره‌های خاکستری تفاوت بیان معنی‌داری در مقایسه دو ژنوتیپ نداشتند، اما توسط تجزیه و تحلیل شبکه به عنوان ژن‌های اتصال‌دهنده (ژن‌های موردنیاز برای ارتباط ژن‌های کاندیدا) بازیابی شدند. رنگ یال‌ها: قرمز نشان‌دهنده برهمکش متشق شده از شبکه هم‌بیانی است. هیچ برهمکش تنظیمی در خوش‌گزینی 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.

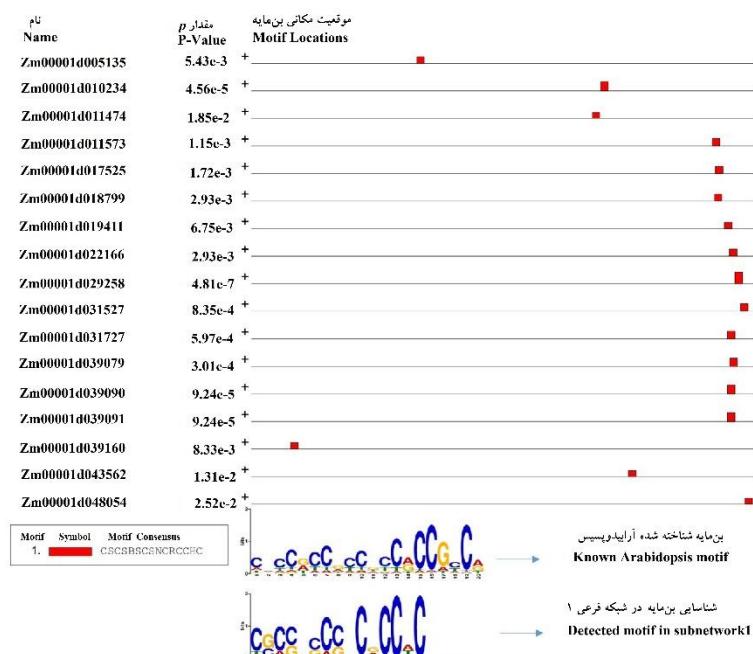
وجود دارد (Zm00001d039091، Zm00001d011474 و Zm00001d039090). نتایج مطالعات قبلی نشان داده است که فعالیت ژن‌های دارای فعالیت GTPase در همئوستازی یون، به ویژه برای حفظ همئوستازی یون‌های سدیم و پتاسیم در شرایط تنفس شوری ضروری است (Ngara *et al.*, 2012). به عنوان نمونه، افزایش بیان یکی از ژن‌ها با فعالیت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

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

ژن‌های خوش دوم به صورت معنی‌داری در فرآیندهای مرتبط با "کاهش اکسیداسیون" مشارکت دارند، بنابراین ژن‌های کاندیدا در این خوش در همئوستازی و تنظیم گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در طول تنفس شوری دخالت دارند که این بافت به نتایج سایر محققان سازگار است (Singh *et al.*, 2013). بازیابی 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 به عنوان مولکول‌های دریافت پیام برای تحریک آبشارهایی از مسیرهای پیام‌رسانی عمل می‌کنند که منجر به درک و فعال شدن پاسخ‌های متناسب و به موقع به تنفس شوری می‌شود (Choudhury *et al.*, 2013). ژن‌های کاندیدا در این خوش (گره‌های قرمز) ارتباط مستقیم ندارند، بلکه از طریق چند ژن اتصال‌دهنده متصل می‌شوند (شکل ۳، شبکه فرعی ۲). خوش‌های کوچک‌تر (۴، ۵، ۶) به ترتیب در متابولیسم "گلوتاتیون"، "بیوسنتز تریپوفان" و "بیوسنتز لیگنین" مشارکت دارند. اهمیت و نقش این مسیرهای زیستی در تنفس شوری در مطالعات قبلی آشکار شده است. گزارش شده است که گلوتاتیون گیاه را در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از تنفس شوری محافظت می‌کند (Nazar *et al.*, 2015). از طرف دیگر، تریپوفان پیش‌ساز اصلی ایندول استیک اسید (IAA) و پیش‌ساز چندین املاح سازگار است که در همئوستازی یونی و اسمزی در شرایط تنفس شوری دخیل هستند (Zahir *et al.*, 2010). به علاوه تنظیم بیوسنتز لیگنین به عنوان عامل اصلی افزایش تحمل تنفس شوری در گیاهان شناسایی شده است (Liu *et al.*, 2018). ژن‌های انتقال‌دهنده (Transporter) با نقش شناخته شده در همئوستازی یون در خوش‌های 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 آرابیدوپسیس، 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 متتحمل و حساس را توجیه کند که می‌تواند هدف مناسبی برای برنامه‌های بهنژادی باشد.

ژن‌های انتخاب شده خوش اول یافت شد. این بن‌ماهه در ۱۷ سکانس از ۲۱ دنباله در نظر گرفته شده قرار داشته و در اکثر توالی‌ها موقعیت مکانی بن‌ماهه بسیار نزدیک به TSS است (شکل ۴). بن‌ماهه شناسایی شده شباهت بسیار بالایی با یک بن‌ماهه شناخته شده در گیاه آرابیدوپسیس دارد که محل اتصال عامل رونویسی FUF1 (AT1G71450) است. یکی از زیرخانواده DREB A-4 از عامل رونویسی ERF/AP2 است که بیان آن در ریشه گیاه آرابیدوپسیس به طور معنی‌داری



شکل ۴- بن‌ماهه (موتیف) محافظت شده شناسایی شده در توالی راهانداز ژن‌های موجود در خوش اول در ژنوتیپ‌های ذرت موقعیت مکانی بن‌ماهه شناسایی شده متمایل به ناحیه بالادستی شروع رونویسی (TSS) بوده و شباهت زیادی با بن‌ماهه شناسایی شده در گیاه آرابیدوپسیس که محل اتصال عامل رونویسی ۲.۳۲e-۰۴ (Q-value 2.32e-04) FUF1 است، دارد. لوگوی اول بن‌ماهه آرابیدوپسیس است که از داده DAP-sequencing بدست آمده و لوگوی دوم نشان‌دهنده بن‌ماهه شناسایی شده در خوش اول می‌باشد *de novo*

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-sequencing 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 بن‌ماهه و عامل رونویسی را نشان

Dr. Muhammad Agricultural University, China  
COMSATS University Islamabad, Pakistan از Sajjad RNA جهت فراهم کردن امکان انجام توالی یابی RNA و از آقای دکتر رزگار سید رحمانی از Department of Plant Biotechnology and Bioinformatics, Ghent University, Ghent, Belgium جهت کمک در تجزیه داده‌ها، شکر 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-Maghriby, H. Elansary, Y. M. Hafez, E. I. Ibrahim, M. El-Banna and A. Elkellish. 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>.
- Amirkabhtiar, 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.
- Virlouvet, 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 its 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.<sup>1</sup>, S. Dezhsetan<sup>2</sup> and R. Darvishzadeh<sup>3</sup>

### 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)