شناسایی و بررسی انتولوژی ژنهای کاندید احتمالی در فرایند جوانه زنی گل جالیز در پاسخ به سیگنال های[1] GA3 و SLs[2]

نجمه سلیمانی ۱، محمد زارع مهرجردی[2]، امین میرشمسی کاخکی*[3].

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

۲. استادیار، مجتمع اموزش عالی شیروان، دانشکده کشاورزی شیروان، ایران

۳. استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

* نویسنده مسئول (mirshamsi@um.ac.ir)

چکیده

علف‌های هرز انگلی متعلق به خانواده *Orobanchaceae* از خسارت آور ترین علف‌های هرز انگلی می‌باشند. گونه‌های گل جالیز انگل کامل گل دهنده و فاقد کلروفیل بوده که با اتصال به ریشه میزبان، خسارت جبران ناپذیری به گیاه وارد می‌کنند. GA_3 و SL به‌عنوان محرک‌های جوانه‌زنی گل جالیز شناخته‌شده‌اند. برای درک بهتر تأثیر این دو هورمون بر بیان ژن‌های موثر در جوانه‌زنی بذر گل جالیز، داده‌های خام ترانسکریپتوم به‌دست‌آمده از مقالات مرتبط با جوانه‌زنی آرابیدوپسیس که در آن‌ها مسیرهای بیوسنتز و انتقال پیام این دو هورمون، مورد جهش قرارگرفته بودند، موردآنالیز قرار گرفت. آنالیز انتولوژی با استفاده از نرم‌افزار Mapman برای مشخص کردن عملکرد هر یک از ژن‌ها انجام شد و به منظور تخمین سطح بیان هر ژن تحت تاثیر تیمارهای هورمونی، نقشه بیانی (Heatmap) آن هاترسیم شد. این داده‌ها با ۲۰۰۰ ژن موجود در مقالات مرتبط نیز مورد مقایسه قرار گرفت و ۸۵ ژن مشترک به‌عنوان ژن‌های کلیدی مشخص گردیدند. در نهایت ژن‌هایی که تحت تأثیر هورمون‌های GA_3 و GA_3+SL تغییرات بیان معنادار ی نشان دادند، به عنوان ژن‌های کلیدی احتمالی در مسیر جوانه‌زنی گل جالیز مشخص شدند.

کلمات کلیدی: جوانه‌زنی، فیتوهورمون، GA_3، Strigolactone ، *Orobanche*

مقدمه

فیتوهورمون استریگولاکتون (SL) حاصل از کاروتنوئیدها به همراه جیبرلین (GA3) در بسیاری از فرایندهای مهم رشد گیاه نقش دارند (Lantzoun *et al*., 2017). به‌طورکلی GAs در تحریک فرآیندهای ضروری ازجمله جوانه‌زنی، رشد طولی گیاه و زمان گلدهی و همچنین پاسخ‌ها به تنش‌های زیستی و غیر زیستی نقش دارند (Colebrook, Thomas, Phillips, & Hedden, 2014;

1Giberelin

2 Strigolactone

(Fonouni-Farde, Diet, & Frugier, 2016). علی‌رغم اینکه نقش SLs در ایجاد تعاملات همزیستی بین گیاهان و *rhizobia* یا *Arbuscular mycorrhiza* از گذشته کاملا شناخته‌شده است، با این‌حال نقش کلیدی آن‌ها به‌عنوان ترکیبات سیگنالینگ درون‌زا در فرایند جوانه زنی تاکنون کمتر موردتوجه قرارگرفته است (Gutjahr *et al*., 2015) . بررسی‌های اخیر نشان می‌دهد که سیگنال‌های GA3 و SL از تشابه قابل‌ملاحظه‌ای در سطح مولکولی و مکانیسم برخوردارند(Santner, Calderon-Villalobos, & Estelle, 2009; Waters, Gutjahr, Bennett, & Nelson, 2017). احتمالا این تشابه بین مسیرهای سیگنالینگ GA3 و SL منشأ تکاملی داشته و می‌تواند تعامل مولکولی احتمالی بین اجزای مسیرهای سیگنالینگ آن‌ها را نشان دهد(Lantzouni *et al*., 2017). شناخت مسیرهای بیوسنتز این دو هورمون و تاثیری که ژن‌های دخیل در این مسیر بر جوانه‌زنی گل جالیز دارند، می‌تواند در طراحی استراتژی های مناسب جهت مبارزه و کنترل این علف هرز انگلی حایز اهمیت باشد. برای مبارزه با گل جالیز روش‌های مختلفی شامل کنترل شیمیایی، زراعی، فیزیکی، بیولوژیکی و استفاده از گیاهان میزبان مقاوم به کار می‌رود. اما به چند دلیل ازجمله باروری بالا، بقا بذر در خاک، توسعه اولیه در زیر سطح خاک ، هماهنگی شدید چرخه‌ی زندگی انگل و میزبان و هم‌چنین کمبود منابع ژنتیکی مقاومت در گونه‌های زراعی، هیچ‌کدام باعث کنترل موفق این گیاه انگل نشده است (Aly 2007)، به همین علت توسعه استراتژی های مبتنی بر مهندسی ژنتیک ضروری به نظر می‌رسد. موفقیت این استراتژی ها به شناسایی ژن‌هایی که تولیدات آن‌ها به‌صورت انتخابی از رشد انگل جلوگیری کرده یا باعث خاموشی یک ژن کلیدی در انگل می‌شود، بستگی دارد. به همین علت در این بررسی، به‌منظور مطالعه تغییر بیان ژن‌های موجود در مسیرهای سیگنالینگ GA3 و SL در مرحله جوانه‌زنی، پروفایل ترانسکریپتوم گل جالیز مورد آنالیز قرار گرفت.

مواد و روش

در این بررسی از داده‌های خام RNAseq موجود جهت شناسایی ژن‌های کلیدی پاسخ‌دهنده در فرایند جوانه‌زنی گل جالیز استفاده شد(جوانه زنی گل جالیز بدین صورت انجام می‌شود که ابتدا بذور در اتانول ۷۰ درصد به مدت دو دقیقه، هیپوکلریت سدیم۵ درصد به مدت ۱۰دقیقه، ضدعفونی شده و سپس با آب مقطر استریل به‌مدت ۱۵ دقیقه آبشویی می‌شوند. مرحله آماده‌سازی بذور در پتری دیش‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب استریل به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و تاریکی انجام می‌گیرد. سپس بذور گل جالیز به کمک هورمون GA3 و یا GR24 جوانه‌دار می‌شوند). به‌طور مقدماتی ژن‌هایی که در تیمارهای GA3، GR24، GA3 +GR24 در بازه زمانی (۳۰،۶۰،۱۲۰) دارای تغییرات معناداری(p-value<0.01) Fold change>1 بودند شناسایی شدند. در ادامه به‌منظور بررسی روند تغییرات بیان ژن‌های احتمالی دخیل در فرایند جوانه‌زنی، ترسیم نقشه بیان(Heatmap) با استفاده از نرم‌افزار Mapletree (version 0.2.3.2 BETA) صورت گرفت و ژن‌هایی که بیشترین و کمترین تغییر بیان را تحت تأثیر سیگنال‌های GA و SLs نشان دادند مشخص شدند. سپس این ژن‌ها با ۲۰۰۰ ژن کاندید دخیل در جوانه‌زنی بذور گل جالیز که در سایر مقالات (Ogawa et al., 2003)، (Bassel et al., 2011)گزارش شده بود مقایسه گردید. در نهایت با بررسی نقشه بیانی، ژن‌هایی که افزایش و یا کاهش بیان معناداری را نشان داده بودند به‌عنوان ژن‌های کلیدی دخیل در روند جوانه‌زنی معرفی گردید. به‌منظور بررسی عملکرد مولکولی ژن‌های کلیدی و نقش آن‌ها در سلول‌های گیاهی، آنالیز انتولوژی این ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mapman (version 3.5.1R2) انجام شد، هم‌چنین بلاست این ژن‌ها با توالی ژن‌های گل جالیز موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI انجام گرفت.

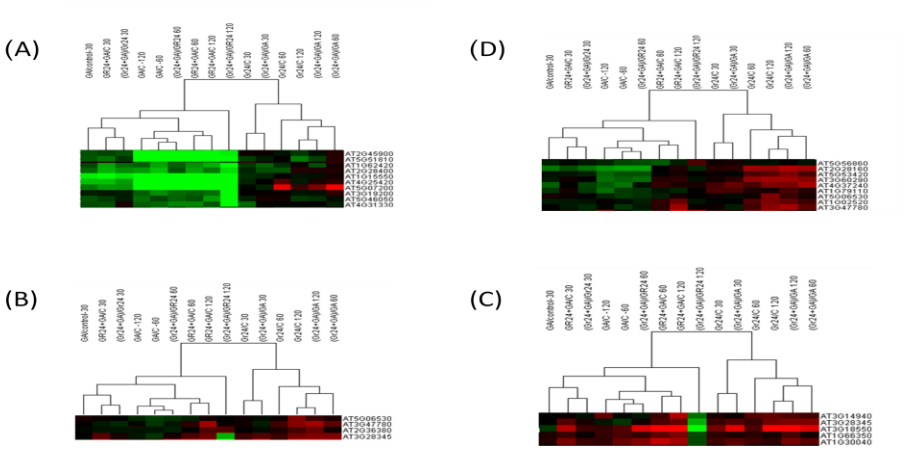
نتایج و بحث

سرکوب بیان ژن های مسیر بیوسنتز GA. نتایج تغییر الگوی بیان ژن‌های کاندید در پاسخ به سیگنال های GA و SLs، نشان داد که صرف‌نظر از نوع سیگنال هورمونی، الگوی تغییرات بیان افزایشی و کاهشی مشترک در ۸۳ ژن کاندید مشاهده می‌شود. نتایج

همچنین نشان داد که GA3 موجب کاهش بیان شدید گروهی از ژن‌ها (۴۳٪) در بازه های زمانی مختلف می شود. عملکرد احتمالی این دسته از ژن با استفاده از آنالیز انتولوژی، مشخص گردید. از مهمترین ژنهایی که تحت تاثیر GA3 کاهش بیان نشان داده اند می‌توان به ژن‌های GA20OX3,GA20OX2,GA20OX1, GA3OX1 که در مسیر بیوسنتز جیبرلین نقش کلیدی دارند اشاره کرد. هیچ‌کدام از این ژن‌ها بعد از تیمار GR24، تغییر قابل‌توجهی نشان ندادند. هم‌چنین LB01(AT3G21420)، یکی از مولفه-های سیگنالینگ SL، در حضور GA3 کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده‌ی تأثیر منفی GA3 بر سیگنالینگ SL است. (شکل A1).

تنظیم بیان ژن‌های ترانسپورتر استریگولاکتون و جیبرلین بوسیله GA3 و GR24. درمیان ۵۳ عضو از خانواده NITRATE RANSPORTER1/PEPTIDE TRANSPORTER(NPF) که شامل حمل‌کننده‌های GA3 می‌باشند، سطح رونویسی NPF3.1(AT1G68570) در حضور GA3 کاهش می‌یابد در حالی‌که GA3 باعث افزایش سطح بیان NPF2.5 (AT3G45710) می‌شود. علاوه بر این، NPF1.1 (AT3G16180) و NPF5.8 (AT5G14940) هنگامی‌که GA3 همراه با GR24 اعمال می‌شوند، افزایش بیان را نشان می‌دهند و GR24 به‌تنهایی بر روی پروفایل بیان ژن‌های NPF تأثیر ندارد. گروهی از ترانسپورترهای GR24، همانند ABCA7 (AT3G47780), BCB15(AT3G28345),ABCG34(AT2G36380), ABCG22(AT5G06530)که متعلق به اعضای خانواده‌ی ABC هستند به شدت توسط GR24 تنظیم‌شده و افزایش بیان را بخصوص در پاسخ به این تیمار در ۱۲۰ دقیقه نشان می‌دهند، در حالی‌که GA3- القای این گروه از ترانسپورترها را سرکوب می‌کند (شکل B1).

اثر سینرژیک دو هورمون در تنظیم بیان مجموعه‌ای از ژن‌ها. نتایج بدست آمده حاکی از اثر افزایشی قوی در استفاده توأم GA3+ GR24 در مجموعه‌ای از ژن‌ها در مقایسه با کاربرد تنها یک هورمون می‌باشد. به‌طور مثال SMXL8(AT G40130) و همچنین BRC1(AT3G18550)که در مسیر سیگنالینگ SL حضور دارند، بیان بالای سینرژیک را در تیمارهای ترکیبی نشان می‌دهند که این امر تاثیر GA3 بر مسیر SL را نشان می‌دهد. (شکل ۱C و جدول ۱). همچنین نتایج نشان می دهد که GA3و GR24 علاوه بر اینکه می‌توانند تأثیرات سینرژیک بر بیان ژن‌ها داشته باشند، می‌توانند عکس یکدیگر عمل کرده و تأثیر کاملا " متفاوت بر بیان ژن‌ها بگذارند که از مهمترین آن‌ها می‌توان به ABCG22(AT5G06530)اشاره کرد که در حضور GR24 افزایش بیان دارد اما GA3 القای آن را سرکوب می‌کند. (شکل ۱D و جدول ۱). مشاهدات ما یک اثر سینرژیک قوی بین سیگنالینگ GA3 و GR24 در سطح مولکولی و هم‌چنین تاثیر منفی هر یک از هورمون‌ها بر بیان بعضی از ژن‌های مسیر بیوسنتزی در مرحله جوانه‌زنی گل‌جالیز نشان می‌دهد که با داده‌های به‌دست آمده از مقاله (Lantzoun *et al*., 2017) مطابقت دارد.



شکل ۱- تاثیر هورنهای GA3 و GR24 بر تغییر بیان ژنها با استفاده از ترسیم heatmap. A- بررسی روندکاهشی تغییرات بیان چند ژن تحت تاثیر GA3. B- تاثیر SL بر ترانسپورترهای جیبرلین. – C تاثیر سینرژیک هورمونها بر بیان گروهی از ژن ها. D- تاثیرات متفاوت GA3 و GR24 بر بیان مجموعه ای از ژن ها

Gene arabidopsis	Ontology		Gene orobanche	E
AT5G56860	GATA type zinc finger transcription factor family protein	-	OrAeBC5_9762.12	0.00002
AT2G28160	FER-like regulator of iron uptake.Transcription factor FER-LIKE IRON DEFICIENCY	-	not found	_
AT5G53420	CCT motif family protein	-	OrAeBC5_9607.1 OrAeBC5_9607.2	1E-45 1E-45
AT3G60290	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-	not found	_
AT3G47780	ABC2 homolog 6. ABC transporter A family member 7	-	OrAeBC5_6323.2	0
AT3G14940	glycolysis.cytosolic branch.phospho-enol-pyruvate carboxylase (PEPC)	+	OrAeBC5_7162.1	2E-71
AT3G28345	transport.ABC transporters and multidrug resistance systems	+	OrAeBC5_820.3	2E-83
AT3G18550	RNA.regulation of transcription.TCP transcription factor family	+	not found	_
AT1G66350	RGA-like 1. DELLA protein RGL1.hormone metabolism.gibberelin.signal transduction	+	OrAeBC5_5283.1	2E-92
AT1G30040	gibberellin 2-oxidase. Gibberellin 2-beta-dioxygenase 2	+	OrAeBC5_3126.1	9E-67
AT2G40130	Double Clp-N motif-containing P-loop nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	+	not found	_

جدول ۱- اثر سینرژیک دو تیمار هورمونی بر تغییر بیان مجموعه‌ای ار ژن‌ها (علامت+) و تاثیر متفاوت این دو هورمون بر گروهی دیگر از ژن-های مسیر بیوسنتز GA3 و SL(علامت منفی) به همراه بلاست ژن‌های آرابیدوبسیس با گل جالیز

منابع:

Aly, R. (2007). Conventional and biotechnological approaches for control of parasitic weeds. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 43(4), 304-317.

Bassel, G. W., Lan, H., Glaab, E., Gibbs, D. J., Gerjets, T., Krasnogor, N., ... & Provart, N. J. (2011). Genome-wide network model capturing seed germination reveals coordinated regulation of plant cellular phase transitions. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(23), 9709-9714Colebrook, E. H., Thomas, S. G., Phillips, A. L., & Hedden, P. (2014). The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *Journal of experimental biology, 217*(1), 67-75 .

Fonouni-Farde, C., Diet, A., & Frugier, F. (2016). Root development and endosymbioses: DELLAs lead the orchestra. *Trends in plant science, 21*(11), 898-900 .

Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P. B., Puech-Pagès, V., Dun, E. A., Pillot, J.-P., . . . Portais, J.-C. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature, 455*(7210), 189 .

Gutjahr, C., Gobbato, E., Choi, J., Riemann, M., Johnston, M. G., Summers, W., . . . Nadal, M. (2015). Rice perception of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi requires the karrikin receptor complex. *Science, 350*(6267), 1521-1 .۵۲۴

Hedden, P., & Sponsel, V. (2015). A century of gibberellin research. *Journal of plant growth regulation, 34*(4), 740-760 .

Lantzouni, O., Klermund, C., & Schwechheimer, C. (2017). Largely additive effects of gibberellin and strigolactone on gene expression in Arabidopsis thaliana seedlings. *The Plant Journal, 92*(5), 924-938 .

Lopez-Obando, M., Ligerot, Y., Bonhomme, S., Boyer, F.-D., & Rameau, C. (2015). Strigolactone biosynthesis and signaling in plant development. *Development, 142*(21), 3615-3619 .

Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y., & Yamaguchi, S. (2003). Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. The Plant Cell, 15(7), 1591-1604.

Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I. A., & Estelle, M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature chemical biology, 5*(5), 301 .

Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N . . . ,.Yoneyama, K. (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature, 455*(7210), 195 .

Waters, M. T., Gutjahr, C., Bennett, T., & Nelson, D. C. (2017). Strigolactone signaling and evolution. *Annual Review of Plant Biology, 68*, 291-3

Najmeh soleimani[1], Mohammad Zare Mehrjerdi[2], Amin Mirshamsi Kakhki[3*]

1- MSc Student, Department of Biotechnology and Plant Breeding, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2- . Assistant Professor,Shirvan Higher Education Complex,College of Agriculture, Shirvan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

*Corresponding author.(mirshamsi@um.ac.ir)

Abstract

Identification and ontology evaluate candidate genes in the process of germination of broomrape in response to signals GA3 and SLs

The obligate root holoparasite weed Phelipanche aegyptiaca (Egyptian broomrape), is a species from the Orobanchaceae family, which includes some of the most agriculturally damaging weeds. As an obligate holoparasite lacking chlorophyll and effective roots, P. aegyptiaca depends entirely on its host for nutrients and water. GA3 and Strigolactons have been identified as seed germination stimuli in Broomrape. To better understand the effects of these two hormones on the expression of key genes effective in seed germination, raw Arabidopsis transcriptome data from germination-related articles were used to analyse the biosynthesis and signal transduction pathways of these two hormones. Ontology analysis was performed using Mapman software to determine the function of each gene and Heatmap expression map was used to estimate the expression level of each gene under the influence of hormonal treatments. These data were compared with the 2000 genes in the related articles, and 85 common genes were identified as key genes. Finally, genes that showed significant expression changes under the influence of GA3 and GA3 + SLs were identified as potential key genes in the germination pathway.

Keywords: Germination, Phytohormone, GA3, Strigolactone, Orobanche