

## Reconstruction of Gene and Protein Networks in Response to Salt Stress in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Using RNA-seq Data

**Omid Mohammadalizadeh** 

Former MSc Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: o.m.alizadeh@ut.ac.ir

**Valiollah Mohammadi** 

Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: vmohammadi@ut.ac.ir

**Reza Darvishzadeh** 

\*Corresponding author. Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

**Masoumeh Sharifi Alishah** 

Former MSc Student, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: shrifi\_7067@yahoo.com

---

### Abstract

#### Objective

Sunflower is one of the most important oilseed products in the world, providing 12% of vegetable oils. Due to the molecular complexity involved in salt stress and its role to physiological and morphological changes in plants, as well as the moderate sensitivity of sunflower to this problem, the purpose of this work is elucidating with priority what affect on the proteins level has a cause-and-effect relationship with tolerance mechanisms.

#### Materials and methods

FastQC and Trimmomatic were used to process RNA-seq data that was taken from the study by Sharifi et al., (2022). RNA-seq analysis was then carried out using genome-based and de novo assembly techniques. Bowtie2 and Hisat2 were used to map the reads to the reference transcriptome and genome, respectively. RSEM and HT-seq were used to quantify the reads, and edgeR and DE-seq2 were used to identify differentially expressed genes (DEGs). Using the STRING and GeneMANIA databases, DEGs in Arabidopsis were found and incorporated into the Gene Regulatory Networks (GRN) and Protein-Protein Interaction (PPI) networks. Topological analysis of these networks was conducted using 11 algorithms in Cytoscape, and hub genes were identified. The promoter sequences of these genes were analyzed using Plantcare. Finally, the expression of *COPI* gene was evaluated using Real-time PCR.

## Results

RNA-seq analysis using de novo assembly-based and reference genome-based methods identified 1602 transcripts and 272 genes with distinct expression patterns. Study on GRN and PPI networks led to the discovery of 29 hub genes, including *BAK1*, *ETR1*, *GER3*, *HSP70*, *CDKB2;2*, *CAS*, *GRDP1*, *BSL3*, *CPN20*, *AOR*, *MCM7*, *DXS*, *AdoMet-MTases*, *RCA*, *CYP90C1*, *C3H37*, *CDPK6*, *Lac1*, *WRKY50*, *COP1*, *PP2C76*, *CaM-7*, *Histone H1-3*, *PPR*, *LRR-RLK*, *LACS*, *LUT5*, and *Clp5*, which play roles in key cellular processes such as plant hormone regulation (ABA, BR, ethylene), MAPK signaling, RNA processing, photosynthesis, stomatal control, protein structure maintenance, and cell cycle. Promoter analysis revealed the existence of important motifs including W-box, TGA-box, ERE, ABRE, MYC, MYB and MBSI and MBS GT-1 motif which led to the co-regulatory role in salt stress response. The real time PCR results of the *COP1* gene, which is one of the ABA-activated genes, were consistent with its expression profile from RNA-seq analysis.

## Conclusion

The current study through systems biology approach revealed that sunflower directs gene functions in central biological activities, such as plant hormone signaling pathways (ABA, BR and ethylene), MAPK pathway RNA transport, photosynthesis, stomatal function control protein structure stabilization, the cell cycle etc., under salt stress. These results enhance our understanding of the molecular basis of salinity tolerance and can be used to genetically engineer sunflowers for enhanced salinity resistance.

**Keywords:** RNA-seq, sunflower, salt stress, promoter analysis, protein-protein interaction network (PPI), gene regulatory network (GRN), and real-time PCR

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Mohammadalizadeh, O., Mohammadi, V., Darvishzadeh, R., & Sharifi Alishah, M. (2026). Reconstruction of Gene and Protein Networks in Response to Salt Stress in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Using RNA-seq Data. *Agricultural Biotechnology Journal*, 18(2), 69-114.

*Agricultural Biotechnology Journal*, 18(2), 69-114.

DOI: 10.22103/jab.2026.23701.1581

Received: December 04, 2025.

Received in revised form: January 31, 2026.

Accepted: February 01, 2026.

Published online: February 28, 2026.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.



© the authors

## Introduction

Among all non-biological stresses affecting food security, soil salinization is one of the most serious endangering problems to food supply. It is estimated that in order to feed a global population of over 10 billion people by 2050, agricultural production must increase between 50-75% to meet the growing demands across the world. Yet in the past 50 years, poor water

management and climate change has exacerbated salinity in soil, affecting production potential. *Helianthus annuus* L., sunflower (Asteraceae), is one of the most significant oilseed crops, being responsible for 12% of global production. Furthermore, it is moderately salt sensitive ( $5ds.m^{-1}$ ) crop with a wide genetic diversity in seed yield and salt tolerance traits. Thus, the breeding and selection of salt-tolerant sunflower varieties are vital targets for increasing productivity and for securing global food demands. Salt stress damages plants in two phases: (a) osmotic phase, when the salt accumulates in the soil around roots resulting in decreased water uptake and leak from the roots, water deprivation causing wilting of plants; and (b) ionic phase, when plant has to cope with excessive influx of  $Na^+$  and  $Cl^-$  ions disturbing ion homeostasis which hampers photosynthesis as well as metabolism. Plants respond to salt stress by inducing the expression of genes involved in ion homeostasis, osmoregulation, antioxidative defense and hormonal signaling. Plant hormones, including ABA, ethylene and brassinosteroids (BRs) are pivotal factors to experience for the responses under salt stress. For example, ABA mediates the expression of genes involved in the response to stress through the *PP2C-SnRK2* route. Ethylene also regulates related genes by transacting through the *EIN2* and *EIN3/EIL* transcription factors. Brassinosteroids control stress genes by a *BRI1-BSK-BIN2*-dependent pathway. Membrane-bound receptor kinases (*RLKs*) can sense environmental signals, which in turn activate the calcium signaling pathways and control a series of transcription factors expression including *bZIP*, *NAC*, *MYB* and *WRKY*. These factors contribute to the maintenance of ion homeostasis, antioxidative defence and environmental stress adaptation. Under salt stress, the expression of molecular chaperones increases to maintain protein stability. This process involves ROS and  $Ca^{2+}$  pathways, MAPK activation, and *HSF/DREB* transcription factors, as well as the protein response to unfolded protein (UPR) mechanism. Simultaneously, expression of cell cycle-related genes decreases to allocate energy to defense systems. The trait of salt tolerance is a complex quantitative character, which depends on multiple genes. It is important to find these genes and analyze their interrelations in the adaptation responses, which will be valuable for molecular breeding of salt-tolerant plants. So far, only some traditional mutation induction and specific gene expression manipulation have shown the slight affected result. In the past, advances in omics technologies as well as systems biology offers the possibility to have an integrated view of genomes, transcriptomes and proteomes. Systems biology integrates mathematical modeling and simulation rooted in genetic information into understanding the processes of life and establishing associations between cellular building blocks. Biological networks such as the gene regulatory networks (GRNs) and the protein-protein interaction networks PPI networks are of importance for modeling cellular processes and identifying functionally relevant molecular interactions. Different studies have reported the analysis of sunflower gene expression when salt is applied.

The results indicate that salt stress significantly impacts gene expression, but a complete understanding of gene function within the cellular system and their interactions remains to be fully achieved. The purpose of this study was to obtain more insights into adaptation processes in sunflower challenged with salt stress by reconstruction of gene regulatory network and PPI network in salt-stressed sunflower. The objective is to localize major regulatory regions and intermediate changes in transcription that can be used to improve the quality of genetic engineering and breeding approaches for improving sunflower salinity tolerance.

### Materials and methods

This analysis is conducted using the RNA-sequencing (RNA-seq) data of sunflower (*Helianthus annuus* L.) line AS5305 from Sharifi et al., (2022). The raw data of the study consists of 4 samples, two samples under salt stress ( $8ds.m^{-1}$ ) and other two samples under normal conditions ( $2.8ds.m^{-1}$ ). For the purpose of data analysis, multiple fraction collection was conducted 24 h after stress induction, and then followed by RNA extraction and Illumina HiSeq™ 2000 sequencing. The raw reads were preprocessed and quality controlled with FastQC to filter out sequencing errors, adapter contamination, as well as low quality bases. Low quality reads were filtered by using Trimmomatic. For RNA-seq analysis, two complementary approaches were used to map and assemble transcriptome reads: a) De novo assembly: Readset was assembled de novo (independent of genome) with program Trinityrnaseq version 2.8.4. The reads were then mapped to this reference transcriptome using Bowtie2. b) Genome-guided mapping: The reads were mapped to the sunflower reference genome using the HISAT2 version 2.1.0. Gene expression quantification was performed using HT-seq count for the genome-based approach and RSEM for the de novo approach. Low-abundance reads (fewer than 10) were filtered. Count normalization was applied as median of ratios with DESeq2 for both strategies, and the expression levels were compared by differential gene analysis using a  $\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq \pm 2$  and  $p_{\text{adj}} < 0.05$  through genome-based (genome-based method), or a  $\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq \pm 3$  and  $p_{\text{adj}} < 0.03$  via de novo assembled reference (de novo method). The de novo assembly approach was used for annotating DE genes using the Trinotate pipeline, where TransDecoder was implemented to identify ORFs; protein sequences with BLASTX and similarity searches ( $E\text{-value} \leq 10^{-5}$ ); HMMER and Pfam were applied to identify domains; SignalP, tmHMM, and RNAmmer were used in deciphering signal peptides and rRNAs. Annotation in the genome-based method was performed using GTF files and differentially expressed genes (DEGs) of *Arabidopsis* were detected with BLASTX/BLASTP  $E\text{-value} \leq 10^{-5}$ . Go enrichment analysis was performed by David and gProfiler. Both genome-based and de novo methods were used to integrate all significant gene lists within STRING as well as GeneMANIA online resources, for

the reconstruction of protein-protein interactions (PPI) and gene regulatory networks (GRN), respectively. Following network reconstruction was performed in Cytoscape, we determined the hub genes according to topological network parameters including Degree, MCC, MNC, DMNC, Closeness, Betweenness, Stress, EcCentricity Radiality BN and EPC for both PPI and GRN. Promoter regions (2000 bp upstream of the transcriptional start site) of hubgenes were obtained by Phytozome and then submitted to PlantCARE for cis-regulatory elements analysis, emphasizing on the repetitive motifs known to response to hormone signaling (ABRE, ERE, TGA-box), abiotic stress (MYB, MYC, MBS) and light response (G-box GT-1). Lastly, the molecular functions and mechanisms of hub genes were analyzed, from which gene *COPI* (E3 ubiquitin-protein ligase *COPI*), which has been reported to act in ABA signal pathways, was chosen as a candidate key gene for experimental verification. Primers were designed and real time qPCR (qRT-PCR) was used to validate the expression levels of this gene (Student's t test,  $p < 0.05$ ;  $\Delta\Delta\text{CT}$  method; housekeeping gene: Actin).

## Results

In this study, gene expression analysis was performed for a specific transcript between two conditions (control and stress) using both novel de novo and reference genome pooling strategies from the DEseq2 software package. Ultimately, in the de novo pooling strategy, after statistical analyses, 32,651 differentially expressed genes (DEGs) were identified, with 1,602 meaningful genes, including 769 upregulated and 833 downregulated genes, obtained by applying a  $\text{Log}_2\text{foldchange} \pm 3$  and  $\text{padj} < 0.03$  threshold. Similarly, in the reference genome strategy, 28,406 DEGs were detected, with 272 meaningful genes, including 118 upregulated and 154 downregulated genes, identified using a  $\text{Log}_2\text{foldchange} \pm 2$  and  $\text{padj} < 0.05$  threshold. The differential expression analysis of transcripts using the de novo approach revealed significant changes, with 1,602 DEGs, 667 of which had GO and protein sequence annotations in *Arabidopsis thaliana*. In the reference genome-based approach, 272 significant DEGs were identified, with 250 orthologs determined through BLAST in *Arabidopsis thaliana*. Biological data related to gene function and pathway activity, analyzed using g:profiler's enrichment algorithms, indicated that in the reference genome-based strategy, molecular function (MF) groups included ion binding, oxidoreductase activity, and catalytic activity; biological process (BP) groups included response to stimulus, catabolic process of polysaccharides, and response to stress; and cellular component (CC) groups were associated with the extracellular region and apoptosis. In the de novo pooling strategy, MF groups comprised ion binding and catalytic activity; BP groups included cellular and metabolic processes; and CC groups included plastids and cytoplasm. After identifying meaningful DEGs in *Arabidopsis thaliana* using both reference genome and de novo

analysis methods, it was found that 21% of genes identified in both methods were common. 761 unique genes were obtained by taking the union of the genes obtained from both approaches and then removing duplicates, which were subsequently used to build PPI and GRN networks using STRING and GeneMANIA databases. The reconstructed PPI network comprised 748 nodes and 2,865 edges and most of the nodes had 0-5 edges; mostly, they ranged from incoming to outgoing with 0-2.5 and 0-5, respectively, suggesting the protein interaction and regulation. Similarly, the reconstructed GRN network had 766 nodes and 20,889 edges, with most nodes having 50-55 edges, and the majority having 25-30 incoming and 0-10 outgoing edges, which demonstrates gene interaction and regulation. The PPI and GRN networks were analyzed for distribution degree and centrality measures. The distributions of both networks were scale-free, i.e. they followed a power law distribution without scaling (not shown) meaning that few genes are regulated by many other genes, and most are regulated by only a few others. It was also discovered that when a node's degree (number of connections) became larger in both networks, the centrality of this node also increased, and nodes which are located along shorter paths on graphs played more significant roles. The cytohubba algorithms (Deg, EPC, MNC, DMNC, MCC, RAD, BN, EC, Clo, Rad, CC, BC, Str) were used to analyze the networks and identified 16 and 17 hub genes in the PPI network and GRN network. These hub genes, upon removal of duplicates were *BAK1*, *ETR1*, *GER3*, *HSP70*, *CDKB2;2*, *CAS*, *GRDPI*, *BSL3*, *CPN20*, *AOR*, *MCM7*, *DXS*, *AdoMet-MTases*, *RCA*, *CYP90C1*, *C3H37*, *CDPK6*, *Lac1*, *WRKY50*, *COPI*, *PP2C76*, *CaM-7*, *Histone HI-3*, *PPR*, *LRR-RLK*, *LACS*, *LUT5*, and *Clp5*. Promoter sequence analysis of these hub genes confirmed the presence of motifs such as ABRE, ERE, TGA-boX (plant hormone response), W-box (biotic stress), MYB, MYC, MBSI, and MBS (abiotic stress), emphasizing their roles in biological and non-biological stresses. For example the ABRE motif (ABA responsive) was present in 79% of putative promoters and both MYB and MYC motifs (associated with salt and drought stress) were identified in almost all putative promoters. The relative expression of gene At2g32950 E3 ubiquitin-protein ligase *COPI* was finally calculated through  $\Delta\Delta CT$ , getting a FoldChange value equal to 2.75 meaning that the gene resulted in being over expressed at 2.75 folds after  $8ds.m^{-1}$  salt stress treatment for 24 hours. The above expression changes were statistically significant at 0.05 level (Table-2).

## Conclusion

We used an integrated systems biology approach combined with transcriptomics, and gene regulatory network (GRN) modeling as well as protein-protein interaction (PPI) analysis and morphology to study the response of sunflower to salt stress. The combination of these approaches shed the light on how sunflower acquires salt tolerance via a sophisticated array of multifaceted

molecular pathways and detected 29 hub genes as key regulators for salt responses. Based on these results, GO analysis of the identified hub genes indicated that biosynthesis and signaling of plant hormones (abscisic acid, ABA; ethylene; auxin; brassinosteroids) played a critical and predominant role in the sunflower response to salt. Other stress response proteins (i.e., ion sensor domains, calcium-binding proteins) are also important for the sensing of salt stress and improving cellular responses. At genomic and transcriptomic scales, sunflower re-orchestrates rearrangement of gene expression chiefly by tuning stress-related transcription factors, forming gene-soap accessibility, and RNA post-transcriptional processing. Moreover, the overexpression of heat shock proteins, chaperones, and proteases contributes to stabilization and functioning of protein/protein complexes as well as other membrane and cellular envelope proteins in salt stressed organisms. Finally, cell cycle and cell division control genes are involved in conserving energy to support growth and cell survival under stress conditions (Galbraith et al., 1991). Analysis of promoter motif also showed the similar transferring modes for hub genes, implying a synchronously response mode against stresses. The *COPI* gene expression data was further experimentally validated by qPCR to reconfirm the existence of hub genes related to salt tolerance. Our results not only reveal the molecular basis of resistance to salt stress in sunflower, but also lay a foundation for the future improvement of agricultural crops. The hub genes detected in this study could be used as potential target genes for MAS breeding, transgenic and genome-editing studies via CRISPR-Cas9 towards the development of salt-tolerant sunflower. Additionally, the proposed pipeline can be applied to molecular studies of responses to other stresses in other agricultural crops.

#### **Author contributions**

Conceptualization, Omid Mohammadalizadeh and Reza Darvishzadeh; Methodology, Omid Mohammadalizadeh; Investigation, Omid Mohammadalizadeh and Masoumeh Sharifi Alishah; Formal analysis, Omid Mohammadalizadeh; Data curation, Omid Mohammadalizadeh and Masoumeh Sharifi Alishah; Writing—original draft preparation, Omid Mohammadalizadeh; Writing—review and editing, Valiollah Mohammadi and Reza Darvishzadeh; Supervision, Valiollah Mohammadi and Reza Darvishzadeh; Project administration, Reza Darvishzadeh; Funding acquisition, Valiollah Mohammadi and Reza Darvishzadeh. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

#### **Data availability statement**

Data are available from the corresponding author on request.

### **Acknowledgements**

The authors would like to extend their thanks to University of Urmia and Tehran university for supporting this research.

### **Ethical considerations**

There was no fabrication, falsification, plagiarism or other misconduct by the authors.


### **Funding**

This article was financially supported by the University of Urmia, Urmia, Iran and Tehran University, Tehran, Iran. Acknowledgements This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.


### **Conflict of interest**

The authors have no conflicts of interest.

## بازسازی شبکه‌های ژنی و پروتئینی پاسخ به تنش شوری در آفتابگردان (*Helianthus annuus L.*) به وسیله داده‌های RNA-seq

امید محمدعلیزاده 


دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، کرج، ایران. ایمیل: o.m.alizadeh@ut.ac.ir

ولی‌اله محمدی 

دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. ایمیل: vmohammadi@ut.ac.ir

رضا درویش‌زاده 

\*نویسنده مسئول: استاد گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. ایمیل: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

معصومه شریفی‌علیشاه 

دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. ایمیل: shrifi\_7067@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۱۳ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۱۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۲

### چکیده

**هدف:** آفتابگردان با تامین ۱۲ درصد از روغن‌های گیاهی جهان یکی از مهم‌ترین گیاهان روغنی جهان محسوب می‌شود. با توجه به پیچیدگی مولکولی مکانیسم پاسخ به تنش شوری که باعث تغییرات فیزیولوژیک، مورفولوژیک در گیاهان می‌شود و همچنین حساسیت نسبی آفتابگردان به این تنش، هدف از این تحقیق درک مکانیسم‌های مولکولی و شناسایی پروتئین‌های دخیل در تحمل به شوری در آفتابگردان می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در تحقیق حاضر، داده‌های RNA-seq از پژوهش Sharifi و همکاران (۲۰۲۲) استخراج و با بهره‌گیری از نرم‌افزارهای FastQC و Trimmomatic ویرایش گردیدند. پس از آن، آنالیز RNA-seq با دو روش سرهم‌بندی نو پدید و مبتنی بر ژنوم انجام شد. خوانش‌ها به کمک پکیج Bowtie2 به ترنسکرپتوم مرجع و با Hisat2 به ژنوم مرجع نقشه‌یابی شدند. کمی‌سازی خوانش‌ها توسط RSEM و HT-seq و تغییرات در بیان ژن‌ها با استفاده از edgeR و DE-seq2 محاسبه گردید. ژن‌های دارای بیان متفاوت معنی‌دار (DEG) در آراییدوپسیس شناسایی شده و برای بازسازی شبکه‌های تعامل پروتئینی (PPI) و شبکه‌های تنظیمی ژنی (GRN) به پایگاه‌های داده STRING و GeneMANIA وارد شدند. تحلیل توپولوژی این شبکه‌ها با ۱۱ الگوریتم

Cytohubba در Cytoscape انجام و ژن‌های هاب شناسایی گردیدند. توالی راه‌انداز این ژن‌ها در Plantcare مورد بررسی قرار گرفت. در پایان، بیان ژن *COPI* با استفاده از Real-time PCR ارزیابی شد.

**نتایج:** تحلیل RNA-seq با استفاده از روش‌های مبتنی بر سرهم‌بندی نو پدید (دی نوو) و مبتنی بر ژنوم مرجع، به شناسایی ۱۶۰۲ رونوشت و ۲۷۲ ژن با الگوی بیان متفاوت انجامید. مطالعه بر روی شبکه‌های GRN و PPI منجر به کشف ۲۹ ژن هاب گردید که شامل *DXS, MCM7, AOR, CPN20, BSL3, GRDP1, CAS, CDKB2;2, HSP70, GER3, ETR1, BAK1, CaM-7, PP2C76, COPI, WRKY50, Lac1, CDPK6, C3H37, P45090C1, RCA, AdoMet-MTases, LUT5, LACS, LRR-RLK, PPR, Histone H1-3* و *Clp5* هستند که در فرآیندهای کلیدی سلولی از جمله تنظیم هورمون‌های گیاهی (BR, ABA, اتیلن)، پیام‌رسانی MAPK، پردازش RNA، فتوسنتز، تنظیم روزنه‌ها، حفظ ساختار پروتئین‌ها و چرخه سلولی نقش ایفا می‌کنند. تحلیل راه‌انداز این ژن‌ها وجود موتیف‌های کلیدی مانند W-box, TGA-box, ERE, ABRE, MYC, MYB, MBSI, MBS و GT-1motif را که نشان‌دهنده نقش مشترک آن‌ها در واکنش به شوری است را تأیید کرد. در نتایج حاصل از PCR زمان واقعی برای ژن *COPI*، که یکی از ژن‌های فعال در مسیر علامت‌دهی ABA به شمار می‌رود، الگوی بیان آزمایش شده با الگوی مشخص شده توسط RNA-seq همخوانی داشت.

**نتیجه‌گیری:** پژوهش حاضر با استفاده از رویکرد زیست‌شناسی سامانه‌ای نشان داد که آفتابگردان در واکنش به تنش نمکی، فعالیت ژن‌ها را در مسیرهای کلیدی سلولی از جمله مسیرهای پیام‌رسانی هورمونی گیاهی (BR, ABA, اتیلن)، مسیر MAPK، پردازش RNA، فتوسنتز، تنظیم روزنه‌ها، حفظ ساختار پروتئین‌ها و چرخه سلولی، بهینه‌سازی می‌کند. این نتایج، فهم ما از مکانیسم‌های مولکولی تحمل به شوری را تقویت کرده و می‌تواند در بهبود ژنتیکی آفتابگردان به منظور افزایش مقاومت در برابر شوری مفید واقع شود.

**کلمات کلیدی:** آفتابگردان، تنش شوری، RNA-seq، شبکه تنظیم ژنی (GRN) و شبکه برهمکنش پروتئینی (PPI)، تجزیه راه‌انداز، Real-time PCR

**نوع مقاله:** پژوهشی

**استناد:** محمدعلیزاده امید، محمدی ولی‌اله، درویش‌زاده رضا، شریفی علیشاه معصومه (۱۴۰۵). بازسازی شبکه‌های ژنی و پروتئینی پاسخ به تنش شوری در آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) به وسیله داده‌های RNA-seq. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۸(۲)، ۶۹-۱۱۴.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.



© the authors

## مقدمه

در عصر حاضر، رشد جمعیت و تأمین غذای کافی چالشی بزرگ است. پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۵۰ جمعیت جهان از ۱۰ میلیارد نفر فراتر رود که نیاز به افزایش ۵۰ تا ۷۵ درصدی در تولید محصولات کشاورزی خواهد بود (Basso et al., 2024). یکی از موانع اصلی امنیت غذایی، شوری خاک و کمبود زمین کشاورزی به دلیل تغییرات آب و هوایی و روش‌های ناپایدار است (Mustafa

(et al., 2019). آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) با سهم ۱۲ درصدی از روغن‌های گیاهی، یکی از دانه‌های روغنی مهم است و به عنوان یک سیستم مدل مطالعات ژنومی در خانواده *Asteraceae* نیز شناخته می‌شود (Rauf et al., 2017). جنس *Helianthus* تنوع ژنتیکی ارزشمندی برای صفاتی مانند عملکرد دانه و مقاومت به تنش‌ها دارد (Paniego et al., 1999). با توجه به حساسیت نسبی آفتابگردان به شوری با تحمل ۵ دسی‌زیمنس بر متر، توسعه ارقام جدید با عملکرد بهتر در شرایط شوری می‌تواند به امنیت غذایی جهانی کمک کند (Kaya et al., 2003). تنش شوری گیاهان را در دو مرحله تحت تأثیر قرار می‌دهد: ابتدا، تنش اسمزی ناشی از تجمع املاح در خاک که باعث پژمردگی می‌شود؛ دوم، جذب یون‌های سمی سدیم و کلرید که تعادل یونی را مختل کرده و فتوسنتز، رشد و متابولیسم را کاهش می‌دهد (Munns & Tester, 2008; Cuin et al., 2011). گیاهان برای مقابله با تنش شوری، ژن‌های مرتبط با تعادل یونی، تنظیم اسمزی، دفاع آنتی‌اکسیدانی و سیگنالینگ هورمونی را فعال می‌کنند. این پاسخ‌ها توسط شبکه‌های سیگنالینگ هورمونی مانند ABA، اتیلن و براسینواستروئیدها (BRs) تنظیم می‌شوند (Gollmack et al., 2014). ABA با افزایش بیوسنتز، مسیر *PP2C-SnRK2* را فعال کرده و بیان ژن‌های پاسخ به تنش را تنظیم می‌کند (Fujita et al., 2013). اتیلن نیز با افزایش بیوسنتز، مسیر *EIN2* و فاکتورهای رونویسی *EIN3/EIL* را فعال کرده و ژن‌های پاسخگو به اتیلن را تنظیم می‌کند (Cheng et al., 2013). همچنین براسینواستروئیدها (BRs) با فعال‌سازی مسیر *BRI1-BSK-BIN2* و فاکتورهای *BES1/BZR1*، ژن‌های پاسخ به تنش را تنظیم می‌کنند (Wang et al., 2022). در ادامه گیرنده‌های کینازی غشایی (*RLK*) با درک تغییرات محیطی، شبکه‌های سیگنالینگ کلسیم را فعال کرده و فاکتورهای رونویسی مانند *bZIP*، *NAC*، *MYB* و *WRKY* را فعال می‌کنند که به حفظ هموستاز یونی، دفاع آنتی‌اکسیدانی و سازگاری به تنش کمک می‌کند (Gollmack et al., 2011; Gharaghanipor et al., 2022). همچنین در تنش شوری، بیان ژن‌های چاپرون‌های مولکولی برای حفظ پایداری پروتئین‌ها افزایش می‌یابد که این امر عمدتاً از طریق مسیرهای *ROS* و  $Ca^{2+}$  با فعال‌سازی *MAPK* و فاکتورهای رونویسی *HSF/DREB* و همچنین مکانیسم پاسخ تاخوردگی پروتئین‌ها (UPR) در ER منجر به القای ژن‌هایی مانند *HSP70* و *BiP* می‌شود (Ul Haq et al., 2019; Trono & Pecchioni, 2022; Wang et al., 2004; Kotak et al., 2009; Nakashima et al., 2009; Tuteja, 2007; Srivastava et al., 2013; Howell, 2013; al., 2007). بیان ژن‌های چرخه سلولی کاهش می‌یابد تا انرژی در اختیار مکانیسم‌های دفاعی قرار گیرد؛ این فرایند با تجمع ABA و فعال‌سازی مسیرهای *SnRK2* و *MAPK* آغاز شده و به القای بازدارنده‌هایی مانند *KRP* و *SIM/SMR* می‌انجامد. علاوه بر این، *ROS* و آسیب DNA مسیر *ATM/ATR* → *SOG1* را فعال کرده و موجب سرکوب فاکتورهای چرخه سلولی نظیر *Cyclin A, B* و *CDK* می‌گردد (Zhang et al., 2020; Carneiro et al., 2021). تنظیم بیوسنتز لیپیدهای غشایی و بازسازی دیواره سلولی نیز به تحمل به تنش شوری کمک می‌کند (Hasanuzzaman et al., 2018). فرآیندهای مطرح شده نشان از این دارد که مقاومت به شوری، صفتی پیچیده و کمی است که تحت کنترل ژن‌های متعدد قرار دارد. شناسایی این ژن‌ها و عملکردشان همراه با سایر عوامل زیستی در فرآیندهای مقاومت، برای استراتژی‌های اصلاح نبات و تولید ارقام مقاوم به شوری حائز اهمیت است. با توجه به ناکارآمدی رویکردهای سنتی مانند ایجاد جهش و تغییر بیان ژن‌های خاص، پیشرفت‌های اخیر در فناوری‌های اومیکس و زیست‌شناسی سامانه‌ای، امکان بررسی جامع ژنوم، ترنسکرپتوم و پروتئوم را فراهم کرده است. زیست‌شناسی سامانه‌ای شاخه میان‌رشته‌ای از زیست‌شناسی است که تلاش می‌کند با تکیه بر مدل‌سازی ریاضی و شبیه‌سازی، رفتار فرآیندهای زیستی و روابط میان اجزای مختلف سلول را به صورت یک کل درک کند (Linghu et al., 2008; Linghu et al., 2009). در این

رویگرد، شبکه‌های زیستی به‌عنوان ابزاری کلیدی به کار می‌روند تا تعاملات مولکولی در قالب یک شبکه از گره‌ها و یال‌ها مدل‌سازی شوند و سپس با کمک روش‌های آماری و نظریه گراف، ارتباطات مولکولی معنادار در این شبکه‌ها شناسایی گردد (Dehmer et al., 2013). در مورد آفتابگردان، تاکنون مطالعات متعددی الگوی بیان ژن تحت تنش شوری را بررسی کرده‌اند؛ برای مثال، Fernandez et al. (2008) با استفاده از میکروآرایه‌های فلورسانس، ۸۰ ژن را در برگ و ساقه آفتابگردان شناسایی کردند که ۵۰ ژن بین تنش شوری و سرمای مشترک بودند (Fernandez et al., 2008). همچنین Barnhart et al. (2022) نشان دادند که دانه‌های آفتابگردان در برابر تنش‌های آبی مختلف مانند خشکی، تنش اسمزی و شوری، الگوی بیان ژنی مشابهی دارند، در حالی که در شرایط کمبود مواد مغذی، الگوی بیان ژن به‌طور قابل توجهی تغییر می‌کند (Barnhart et al., 2022). در ادامه، Sharifi et al. (2022) با توالی‌یابی RNA موفق به شناسایی ۱۲۱ ژن با تغییرات معنادار در بیان تحت تنش شوری شدند و در میان آن‌ها، ژن *MYB44* را به‌عنوان ژن کاندید کلیدی در تحمل به شوری معرفی کردند (Sharifi et al., 2022). مجموعه این یافته‌ها به‌خوبی نشان می‌دهد که تنش شوری، برنامه رونویسی و بیان ژن در آفتابگردان را به‌صورت گسترده دگرگون می‌کند، اما با وجود این پیشرفت‌ها، هنوز تصویر کاملی از عملکرد ژن‌ها در بستر کل سامانه سلولی و نوع برهم‌کنش آن‌ها در دست نیست. به همین دلیل، در این مطالعه از رویکرد شبکه‌محور مبتنی بر داده‌های RNA-Seq استفاده شده تا بازآرایی‌های رونویسی پیچیده در آفتابگردان تحت تنش شوری شناسایی شود. در این چارچوب، بازسازی شبکه تنظیم‌کننده ژنی ( $GRN^1$ ) و شبکه برهم‌کنش پروتئین-پروتئین ( $PPI^2$ ) انجام می‌شود تا مراکز کلیدی تنظیمی در این شبکه‌ها مشخص شده و نقش آن‌ها در سازگاری آفتابگردان به محیط‌های با شوری بالا روشن گردد. انتظار می‌رود نتایج این پژوهش، مسیر را برای طراحی استراتژی‌های هدفمند در مهندسی ژنتیک و برنامه‌های اصلاح نژاد به‌منظور افزایش تحمل به شوری در آفتابگردان و حتی سایر گونه‌های زراعی مهم هموار کند.

## مواد و روش

**سرهمبندی ترنسکرپتوم مرجع و شناسایی ژن‌های دارای اختلاف بیان معنی‌دار:** در گام نخست، داده‌های RNA-seq شامل چهار نمونه (دو تکرار بیولوژیکی تحت شرایط تنش شوری و دو تکرار بیولوژیکی تحت شرایط نرمال) از مطالعه‌ی Sharifi et al. (2022) استخراج گردید. این داده‌ها به‌صورت Paired-end sequencing تولید شده بودند. جهت بررسی کیفیت داده‌های توالی‌یابی و شناسایی توالی‌های با کیفیت پایین، خطاها و آلودگی‌ها، از نرم‌افزار FastQC استفاده شد که ۱۰ آزمون مختلف را برای ارزیابی کیفیت داده‌ها انجام می‌دهد (Andrews, 2010). سپس، داده‌ها با بسته Trimmomatic پیش‌پردازش شدند تا توالی‌های بی‌کیفیت و آلاینده‌ها حذف شوند (Bolger et al., 2014). پس از ویرایش، کیفیت داده‌ها مجدداً با FastQC ارزیابی شد. جهت تجزیه و تحلیل RNA-seq، ژنوم مرجع و فایل GTF آفتابگردان از پایگاه داده Ensemble دریافت شد. ژنوم مرجع با الگوریتم HGF<sup>3</sup> بسته نرم‌افزاری HISAT2 ایندکس شد تا فایل‌های ht2 تولید شود (Kim et al., 2019). به دلیل محدودیت‌های حاشیه‌نویسی ژنوم مرجع، برخی از ژن‌ها شناسایی نمی‌شوند؛ بنابراین، فایل‌های خوانش وارد بسته نرم‌افزاری Trinity نسخه ۲.۸.۴ جهت سرهمبندی ترنسکرپتوم مرجع AS5305 آفتابگردان شد و ترنسکرپتوم مرجع در قالب یک فایل

<sup>1</sup> Gene regulatory network

<sup>2</sup> Protein-protein interaction network

<sup>3</sup> Hierarchical graph FM index

Trinity.fasta ایجاد گردید و از طریق بسته نرم‌افزاری Bowtie2 ایندکس شد تا فایل‌های bt2. تولید شوند (Langmead & Salzberg, 2012; Haas et al., 2013). در مرحله بعد در رویکرد ژنوم بنیان، داده‌های هر نمونه از طریق بسته نرم‌افزاری HISAT2 بر روی ژنوم مرجع ایندکس شده نقشه‌یابی شدند و فایل‌های SAM. خروجی از طریق بسته نرم‌افزاری SAMtools مرتب و ایندکس شده و به قالب BAM. تبدیل شدند (Danecek et al., 2021). در رویکرد سرهم‌بندی نوپدیده، نقشه‌یابی خوانش‌ها با ترنسکریپتوم مرجع توسط بسته نرم‌افزاری Bowtie2 انجام شد و خروجی از طریق بسته نرم‌افزاری SAMtools مرتب و ایندکس شده و به قالب BAM. تبدیل شدند (Danecek et al., 2021). جهت کمی‌سازی بیان ژن‌ها از بسته نرم‌افزاری HTSeq-count در رویکرد ژنوم بنیان (Anders et al., 2015) و از RSEM در رویکرد سرهم‌بندی نوپدیده (Li & Dewey, 2011) استفاده شد. در فایل count.txt خروجی HTSeq-count از ستون‌های Gene name و Count و در فایل RSEM.isoforms.results خروجی RSEM از ستون‌های Transcrip.name و Expected\_count برای ساختن ماتریکس بیان استفاده شد و پیش‌فیلترینگ برای حذف ژن‌های با بیان کم انجام شد و ژن‌هایی که حداقل ۱۰ خوانش داشتند، نگه داشته شدند. در نهایت برای شناسایی ژن‌های دارای اختلاف بیان معنی‌دار (DEGs) در هر دو رویکرد داده‌های بیان با استفاده از طریق بسته نرم‌افزاری DESeq2 و با روش نرمال‌سازی DESeq2's median of ratios نرمال شدند و پس از محاسبات آماری ژن‌هایی با  $\text{Log2FoldChange} \geq \pm 2$  و  $p_{\text{adj}} < 0.05$  در رویکرد ژنوم بنیان و  $\text{Log2FoldChange} \geq \pm 3$  و  $p_{\text{adj}} < 0.03$  در رویکرد سرهم‌بندی نوپدیده به عنوان DEGs معنی‌دار شناسایی شدند (Love et al., 2021). برای رسم نمودار حرارتی ژن‌های DEG از بسته نرم‌افزاری Pheatmap استفاده شد. مقادیر بیان نرمال‌شده این ژن‌ها از آبجکت dds در DESeq2 استخراج، سپس با افزودن ۱، لگاریتم پایه ۲ آن‌ها محاسبه و نمودار حرارتی رسم گردید. همچنین، برای رسم نمودار آتشفشانی،  $\text{Log2FoldChange}$  و  $p_{\text{adj}}$  ژن‌های DEG استخراج و نمودار مربوطه ترسیم شد. پس از شناسایی DEG‌های معنی‌دار در هر دو رویکرد، در رویکرد ژنوم بنیان، از فایل GTF برای حاشیه‌نویسی ژن‌ها استفاده شد. لیست ژن‌های DEG در پایگاه‌های NCBI و Uniprot جستجو و با توالی‌های آرآی‌دی‌و‌پسیس *تالیانا* از طریق ابزار BLASTX/BLASTP با  $E\text{-value} \leq 10^{-5}$  مقایسه شدند و ارتولوگ آنها شناسایی شد و سپس هستی‌شناسی و غنی‌سازی ژنی با استفاده از شناسه Uniprot و توالی پروتئینی ارتولوگ‌ها در پایگاه داده gprofiler انجام گرفت (Raudvere et al., 2019). در رویکرد سرهم‌بندی نوپدیده، از Trinotate (<https://trinotate.github.io/>) برای حاشیه‌نویسی رونوشت‌های با تغییرات بیان معنی‌دار استفاده شد. توالی‌های رونوشت‌ها جهت شناسایی مناطق ORF از طریق نرم افزار TransDecoder تحلیل و توالی‌های نوکلئوتیدی و اسیدآمینو حاصل از لحاظ همولوژی با استفاده از ابزار BLASTX/BLASTP و میزان  $E\text{-value} \leq 10^{-5}$  با توالی‌های پایگاه‌های داده SwissProt و TrEMBL مقایسه شدند سپس نتایج با ابزارهای HMMER و Pfam برای شناسایی دُمین‌ها و خانواده‌های پروتئینی و با RNAmmer، tmHMM، SignalP برای پیش‌بینی پپتیدهای نشانه و شناسایی rRNAها تحلیل شدند. نهایتاً، نتایج در پایگاه داده SQLite Trinotate ادغام و فایل هستی‌شناسی رونوشت‌ها ساخته شد. توالی ژنی و پروتئینی ژن‌های مربوط به رونوشت‌ها که در آرآی‌دی‌و‌پسیس و گونه‌های مختلف شناسایی شده بود استخراج شد و با توالی‌های آرآی‌دی‌و‌پسیس *تالیانا* مجدداً BLAST شدند تا تمامی ارتولوگ‌ها در آرآی‌دی‌و‌پسیس شناسایی شود. سپس هستی‌شناسی و غنی‌سازی ژنی در پایگاه داده gprofiler انجام گرفت (Raudvere et al., 2019).

## بازسازی شبکه های تنظیم کننده ژنی (GRN) و برهمکنش پروتئینی (PPI): شبکه تنظیم کننده ژنی GRN

(Gene Regulatory Network) مجموعه ای از ژن هاست که به صورت غیرمستقیم از طریق محصولات خود باهم و با عوامل دیگر در سلول تعامل دارند. این شبکه از فعل و انفعالات فیزیکی یا تنظیمی بین دو مؤلفه فاکتورهای رونویسی (TFs) و عناصر تنظیم کننده CREs (Cis-Regulatory Elements) که نرخ رونویسی ژن ها به mRNA را کنترل می کنند، تشکیل شده است. شبکه برهم کنش پروتئین-پروتئینی (Protein-protein interaction network) PPI، به تعاملات بین پروتئین ها اشاره دارد که ناشی از نیروهای الکتروستاتیک، پیوندهای هیدروژنی و آب گریزی است. در این شبکه، راس ها شامل پروتئین ها و یال ها شامل ارتباطات پروتئینی هستند. برای بازسازی شبکه ژنی، شناسه های ژنی اورتولوگ های ژن های DE معنی دار آفتابگردان در آرآبیدوپسیس به سرویس GeneMANIA وارد شدند. برای بررسی روابط DEG های آفتابگردان در سطح پروتئین، شناسه های ژنی اورتولوگ ها در آرآبیدوپسیس به پایگاه داده STRING وارد و شبکه PPI بازسازی شد. این پایگاه داده شامل مقادیر PPI تجربی، پیش بینی شده و متنی بین پروتئین هاست. برای بررسی ارتباطات زیستی بین پروتئین ها و ژن های موجود در شبکه های بازسازی شده، فایل های این شبکه ها به نرم افزار Cytoscape وارد شدند. با استفاده از افزونه CytoHubba و ۱۱ الگوریتم محاسباتی آن، ارتباطات و ماژول های مهم شناسایی و ژن های هاب مشخص شدند (Shannon et al., 2003; Chen et al., 2009). این افزونه ۱۱ الگوریتم محاسباتی برای رتبه بندی گره ها بر اساس ویژگی های شبکه ای ارائه می دهد که شامل ۵ روش تجزیه محلی (Degree, MNC, DMNC, MCC) و ۶ روش تجزیه مرکزیت (RAD, BN, EC, Clo, CC, BC, Str) است. روش های تجزیه محلی تنها ارتباط بین یک گره و همسایگان مستقیم آن را در نظر می گیرند، در حالی که روش های تجزیه مرکزیت ارتباط بین یک گره و کل شبکه را بررسی می کنند. هر گره (v) و هر ارتباط (E) در شبکه مشخص می شود و یک تابع (F) به هر گره v یک امتیاز عددی F(v) اختصاص می دهد که رتبه بندی گره ها بر اساس این امتیازها صورت می گیرد؛ به طوری که گره ای با امتیاز بیشتر، رتبه بالاتری دارد.

## تجزیه عناصر تنظیم کننده سیس CERS<sup>4</sup> در راه انداز ژن های هاب شبکه های زیستی: پس از انتخاب ژن های

هاب توسط ۱۱ الگوریتم پلاگین Cytohubba از نرم افزار Cytoscape (Shannon et al., 2003)، Gene names مربوط به آن ها در بانک اطلاعاتی Phytozome (<http://www.phytozome.net>) جستجو شد و ناحیه ژنومی هر یک از آن ها تعیین گردید و توالی مربوط به ۲۰۰۰ bp بالادست کدون AUG (کدون شروع) در ناحیه 5'UTR به عنوان راه انداز استخراج شد و به منظور تجزیه راه انداز و شناسایی عناصر تنظیم کننده سیس المنت از ابزار آنالیم PLANTcare (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) استفاده شد. سپس موتیف های موجود در راه انداز استخراج و کارکرد آن ها مورد بررسی قرار گرفت.

## تایید آزمایشگاهی بیان ژن هاب cop1 به دست آمده از تجزیه شبکه ها: از میان ۳۲ ژن هاب با بیان افتراقی

معنی دار، ژن کلیدی COPI به طور انتخابی گزینش شد. توالی CDS این ژن با شماره دسترسی XM\_022159676.2 از پایگاه داده NCBI دریافت و برای طراحی آغازگر مورد استفاده قرار گرفت. آغازگرها با نرم افزارهای Oligo7، Gene Runner و Fast PCR طراحی و از نظر ساختارهای ثانویه بررسی شدند. سپس بهترین آغازگرها انتخاب و برای سنتز ارسال گردیدند. در مراحل

<sup>4</sup> Cis regulatory elements

آزمایشگاهی Real-Time PCR، استخراج RNA از نمونه‌های برگ‌گی از طریق کیت RNX-Plus™، ارزیابی کیفیت RNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪، سنتز cDNA به وسیله کیت Revert Aid First strand cDNA synthesis، بررسی صحت ساخت cDNA توسط واکنش‌های کنترل -RT و NTC و واکنش کنترل مثبت و بررسی کیفیت cDNA با استفاده از آغازگرهای ژن اکتین در PCR صورت گرفت. در طراحی آغازگرهای ژن *COPI* برای Real-Time PCR، نکاتی مانند طول آغازگرها ۱۸-۲۴ جفت باز با تعادل GC/AT و Tm بین ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد، طول قطعه تکثیری کمتر از ۳۰۰ جفت باز، اجتناب از خود مکملی و تشکیل دایمر بین آغازگرها، و بلاست آغازگرها در برابر توالی‌های NCBI برای بررسی اختصاصی بودن، رعایت شد. اطلاعات تکمیلی آغازگرها در جدول ۱ ذکر شده است. در نهایت جهت سنجش مقدار بیان ژن مورد نظر در گیاهان شاهد و تیمار از طریق روش Real-Time PCR، از دستگاه Rotor gene Q-pure Detection-Qiagen مدل ۶۰۰۰ استفاده شد. ژن اکتین به عنوان ژن مرجع برای نرمال‌سازی داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. واکنش Real-Time PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر با کیت Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR mastermix (5x)، آب عاری از نوکلئاز، آغازگرها و cDNA انجام شد. برنامه حرارتی شامل فعال‌سازی اولیه آنزیم در ۹۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ چرخه واسرشت در ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای مربوطه به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه بود. پس از انجام واکنش، منحنی تکثیر و ذوبی از ۴۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد رسم و صحت تکثیر با منحنی ذوب و تجزیه ژل بررسی شد. کمیت نسبی توسط افزایش تشعشع فلورسنس با نرم‌افزار Rotor-GeneQ اندازه‌گیری شد. مقدار Threshold طوری تنظیم گردید که سیگنال‌های فلورسنت را در فاز نمایی واکنش قطع نماید. نهایتاً مقدار بیان نسبی ژن‌ها با روش  $\Delta\Delta CT$  محاسبه شد و داده‌ها با آزمون t-student در سطح ۵٪ در نرم‌افزار SAS تجزیه و مقایسه میانگین‌ها انجام گرفت (Pfaffl, 2001).

#### جدول ۱. مشخصات آغازگرهای ژن *COPI* مورد استفاده در Real-Time PCR

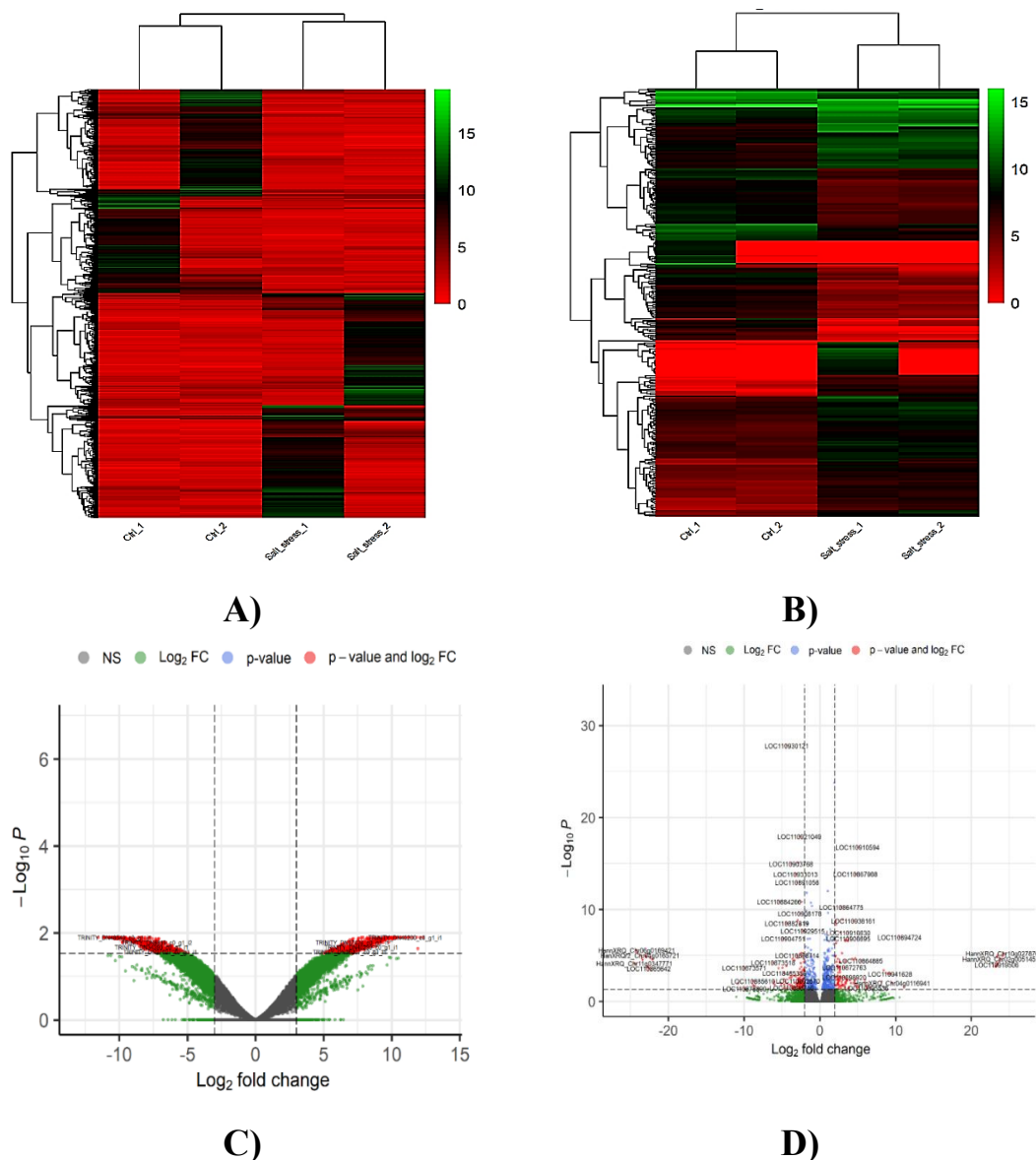
Table 1. Specifications of *COPI* gene primers used in Real-Time PCR

| نام<br>ژن /<br>Gene<br>name | شماره دسترسی /<br>Accession<br>number | توالی آغازگر (5' → 3') /<br>Primer sequence (5' → 3') | دمای اتصال (°C) /<br>Annealing<br>temperature<br>(°C) | طول توالی محصول<br>Product / (bp)<br>sequence length<br>(bp) |
|-----------------------------|---------------------------------------|---|---|--|
| <i>COPI</i>                 | XM_022159676<br>.2                    | Forward:<br>TGTCGTTCTCGGTTACACATC                     | 60.65   | 101  |
|                             |                                       | Reverse:<br>CACCTCTCCCTCTCATCTACATA                   |   |  |

#### نتایج و بحث

نتایج سرهمبندی ترنسکریپتوم مرجع و شناسایی ژن‌های دارای اختلاف بیان معنی‌دار: میانگین تعداد خوانش‌ها در نمونه‌ها قبل از ویرایش ۲۲,۲۰۵,۵۳۵ با طول ۱۵۰ باز و بعد از ویرایش ۲۱,۴۸۷,۹۴۰ با طول ۱۴۸/۱۴۹-۲۰ باز بود. میانگین درصد GC خوانش‌ها قبل از ویرایش ۴۴/۷۵٪ و بعد از ویرایش ۴۴/۵٪ بود. خوانش با کیفیت پایین شناسایی نشد و میانگین کیفیت خوانش‌ها قبل از ویرایش در ابتدای خوانش‌ها ۳۱.۳۷، اواسط ۴۰، و انتها ۳۲.۷۵ بود؛ اما بعد از ویرایش این مقادیر به ترتیب به ۳۷، ۴۰ و ۳۸/۸۷ رسید. استاندارد کدگذاری کیفیت برای سیستم Illumina HiSeq-2000 تحت عنوان

Sanger/Illumina 1.9 بود که همان استاندارد سنجش کیفیت به روش کلاسیک توالی‌یابی سنگر و بر مبنای ۰ تا ۴۰ است. این یافته‌ها نشان‌دهنده کیفیت مناسب خوانش‌ها برای آنالیزهای بعدی بود. در سرهم‌بندی نو پدید ترنسکرپتوم آفتابگردان، پس از ویرایش داده‌ها، ۱۷۱,۹۰۳,۵۲۶ خوانش با درصد GC برابر با ۴۴/۵ استفاده شد و با استفاده از نرم‌افزار Trinityrnaseq، فرآیند سرهم‌بندی توالی‌ها انجام شد. این فرآیند شامل سرهم‌بندی خوانش‌ها به صورت رونوشت‌های اولیه، کلاستر بندی برای تشکیل گراف دیروین و پردازش گراف جهت ارائه گزارش از تمام رونوشت‌ها و ایزوفرم‌ها بود. در نهایت، یک ترنسکرپتوم موتاژ شده با حجم ۲۰۰ مگابایت و فرمت fasta ساخته شد که شامل ۱۲۳,۹۹۳ ژن منفرد و ۲۰۳,۳۷۹ رونوشت با درصد GC، ۴۱/۱۷ بود و میزان N50 برای ژن‌ها و رونوشت‌ها به ترتیب ۱۱۳۷ و ۱۲۷۹ و همچنین K-mer=32 محاسبه شد. که نتایج حاکی از آن بود که فایل خروجی حاصل از سرهم‌بندی خوانش‌ها در وضعیت خوبی قرار دارد و جهت تجزیه‌های پایین‌دستی مناسب است. خوانش‌های خام ویرایش شده به صورت Paired-end با استفاده از نرم‌افزارهای Hisat2 و Bowtie2 به ترتیب بر روی ژنوم و ترنسکرپتوم مرجع هم‌ردیف شدند. نتایج هم‌ردیفی با Hisat2 نشان داد که ۹۴/۰۵ درصد از خوانش‌ها بر ژنوم مرجع منطبق شده‌اند و از این میزان ۸۷/۶۳ درصد به طور منحصر به فرد و به یک مکان، ۴/۰۲ درصد یکبار و غیر منطبق، ۵/۳۵ درصد بیش از یکبار و ۲/۹۹ درصد صفر بار هم‌ردیف شده‌اند. نتایج هم‌ردیفی با Bowtie2 نشان داد که ۹۲/۵۱ درصد از خوانش‌ها بر ترنسکرپتوم مرجع منطبق شده‌اند و از این میزان ۵۹/۷۰ درصد به طور منحصر به فرد و به یک مکان، ۳۳/۷۲ درصد بیش از یکبار و ۶/۵۷ درصد صفر بار هم‌ردیف شده‌اند. در رویکرد ژنوم پایه، نرم‌افزار HTSeq-count برای شمارش خوانش‌های هم‌تراز شده با آگزون‌های ژنوم مرجع استفاده شد. سپس تعداد خوانش‌های هم‌تراز شده با هر آگزون شمارش و بر اساس نام ژن‌های متناظر با آگزون‌ها که در فایل GTF موجود است، گروه‌بندی شدند و در نهایت فایل خروجی txt حاوی نام ژن‌ها و میزان بیان آنها تولید شد. این فرآیند برای هر چهار نمونه انجام و ماتریس بیان تشکیل شد. در استراتژی سرهم‌بندی نوپدید، نرم‌افزار RSEM فراوانی هر ایزوفرم و ژن را به طور جداگانه محاسبه کرد و ماتریس بیان بر اساس ستون expected\_count فایل‌های RSEM.isoform.results تشکیل شد. این ماتریس‌ها به بسته نرم‌افزاری Deseq2 وارد شده و بررسی بیان ژن‌ها و رونوشت‌ها در شرایط کنترل و تنش انجام شد. ماتریس‌های بیان وارد بسته نرم‌افزاری Deseq2 شدند و بررسی بیان ژن‌ها و رونوشت‌ها در شرایط کنترل و تنش انجام شد. در استراتژی سرهم‌بندی نوپدید، با اعمال حدود آستانه  $\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq \pm 3$  و  $P_{\text{adj}} < 0.03$ ، ۱۶۰۲ رونوشت معنی‌دار شناسایی شد که شامل ۷۶۹ رونوشت با افزایش بیان و ۸۳۳ رونوشت با کاهش بیان بود. در استراتژی ژنوم پایه، با در نظر گرفتن حدود آستانه  $\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq \pm 2$  و  $P_{\text{adj}} < 0.05$ ، ۲۷۲ ژن معنی‌دار شناسایی شد که شامل ۱۱۸ ژن با افزایش بیان و ۱۵۴ ژن با کاهش بیان بود. نمودارهای آتشفشانی (Volcano Plot) و حرارتی (Heatmap) مربوط به خروجی تجزیه و تحلیل شناسایی ژن‌های DEG، در شکل ۱ آورده شده‌اند. در نمودار حرارتی، شرایط آزمایش در محور افقی و ژن‌های مختلف در محور عمودی قرار دارند. مقیاس رنگی نشان‌دهنده میزان بیان ژن‌ها است. دندروگرام‌ها گروه‌بندی نمونه‌ها و ژن‌ها را بر اساس شباهت بیان نشان می‌دهند. در شرایط تنش شوری، تغییرات قابل توجه در بیان برخی ژن‌ها مشاهده می‌شود. این نمودار به شناسایی تفاوت‌های بیان ژن‌ها در شرایط مختلف و ژن‌های کلیدی مرتبط با پاسخ به تنش شوری کمک می‌کند. نمودار آتشفشانی نیز ژن‌هایی را که به طور معنی‌دار بین دو گروه Stress و Control متفاوت بیان شده‌اند، نشان می‌دهد. نقاط خاکستری نمایانگر ژن‌های غیر معنی‌دار، نقاط سبز ژن‌های با تغییر بیان معنی‌دار ولی غیر آماری، نقاط آبی ژن‌های آماری معنی‌دار با تغییر بیان کم و نقاط قرمز ژن‌های با تغییر بیان و آماری معنی‌دار هستند.



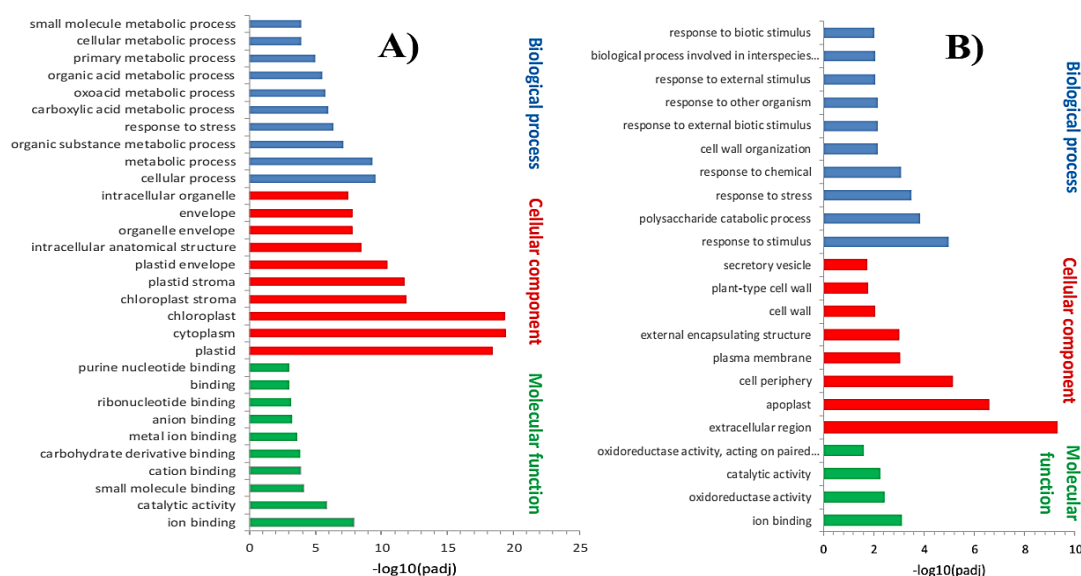
شکل ۱. نقشه حرارتی بیان ژن‌های دارای اختلاف بیان معنی‌دار بین شرایط تنش شوری (Salt\_stress) و نرمال (Ctrl) در (A) رویکرد سرهم‌بندی نوپدید و (B) رویکرد ژنوم‌بیان و نمودار آتشفشانی مربوط به توزیع تغییرات بیان ژن‌ها نسبت به سطح معنی‌داری بین تنش شوری (Salt\_stress) و نرمال (Ctrl) در (C) رویکرد سرهم‌بندی نوپدید و (D) رویکرد ژنوم‌بیان

Figure 1. Expression heatmap of genes with significant expression differences between salt stress (Salt\_stress) and normal (Ctrl) conditions in (a) the *De novo* assembly approach and b) the genome-based approach and the volcano plot related to the distribution of gene expression changes relative to the significant level between stresses Salinity (Salt\_stress) and normal (Ctrl) in (c) Denovo assembly approach and (d) genome-based approach

تجزیه هستی‌شناسی و غنی‌سازی ژن‌های دارای تفرق بیانی معنی‌دار (DEGs) حاصل از دو راهبرد

ژنوم پایه و سرهم‌بندی نوپدید: در این مطالعه، برای حاشیه‌نویسی کارکردی رونوشت‌های با تغییرات بیان معنی‌دار

(DEGs) از دو راهبرد ژنوم پایه و سرهم‌بندی نوپدیده، از بسته نرم‌افزاری Trinotate استفاده شد. نرم‌افزار TransDecoder برای شناسایی و امتیازدهی چارچوب‌های باز خواندن (ORF) به کار رفت و توالی‌های نوکلئوتیدی و اسیدآمین حاصل با پایگاه‌های داده پروتئینی SwissProt و TrEMBL جستجو شدند. ابزارهای BLAST، HMMER، SignalP، tmHMM و RNAmmer برای شناسایی دُمین‌ها، خانواده‌های پروتئینی، پپتیدهای نشانه و هلیکس‌های خارج غشایی استفاده شدند. از ۱۶۰۲ رونوشت با تفاوت بیان معنی‌دار، ۶۶۷ رونوشت با شناسه GO و توالی‌های پروتئینی در *Arabidopsis thaliana* شناسایی شد. در راهبرد ژنوم پایه نیز از ۲۷۲ ژن با اختلاف بیان معنی‌دار، اورتولوگ ۲۵۰ ژن از طریق BLAST در *Arabidopsis thaliana* تعیین شد. داده‌های زیستی مربوط به کارکرد و مسیر فعالیت ژن‌ها با الگوریتم‌های غنی‌سازی در پلتفرم آنالین g:profiler بررسی شد. نتایج غنی‌سازی و هستی‌شناسی (شکل ۲) نشان داد که در راهبرد ژنوم پایه، گروه‌های کارکرد مولکولی (MF) شامل اتصال یونی، فعالیت اکسیدوردوکتازی و فعالیت کاتالیزوری؛ گروه‌های فرآیند زیستی (BP) شامل پاسخ به محرک، فرآیند کاتابولیک پلی‌ساکارید و پاسخ به تنش؛ و گروه‌های مؤلفه سلولی (CC) شامل فضای خارج سلولی و آپوپلاست اهمیت داشتند. در راهبرد سرهم‌بندی نوپدیده نیز، گروه‌های کارکرد مولکولی (MF) شامل اتصال یونی و فعالیت کاتالیزوری؛ گروه‌های فرآیند زیستی (BP) شامل فرآیندهای سلولی و متابولیک؛ و گروه‌های مؤلفه سلولی (CC) شامل پلاستید و سیتوپلاسم اهمیت داشتند.



شکل ۲. نمودار غنی‌سازی و تفسیر عملکردی DEGs حاصل از استراتژی (A) سرهم‌بندی نوپدیده و (B) ژنوم-پایه در سه گروه عملکرد مولکولی (MF: Molecular function)، فرآیند زیستی (BP: Biological process)، اجزای سلولی<sup>۵</sup> (یا مؤلفه‌های سلولی) (CC: Cellular component)

**Figure 2. Enrichment diagram and functional interpretation of DEGs resulting from the strategy A) De novo assembly and B) Genome based in three groups: Molecular function (MF), Biological process (BP), Cellular compounds (CC)**

نتایج ترکیب DEGs حاصل از دو استراتژی و تجزیه توپولوژی شبکه‌های PPI و GRN: پس از شناسایی ژن‌های دارای بیان متفاوت معنی‌دار (DEG) در آرآبیدوپسیس تالیانا با دو روش تجزیه ژنوم‌پایه و سرهم‌بندی نوپدیده،

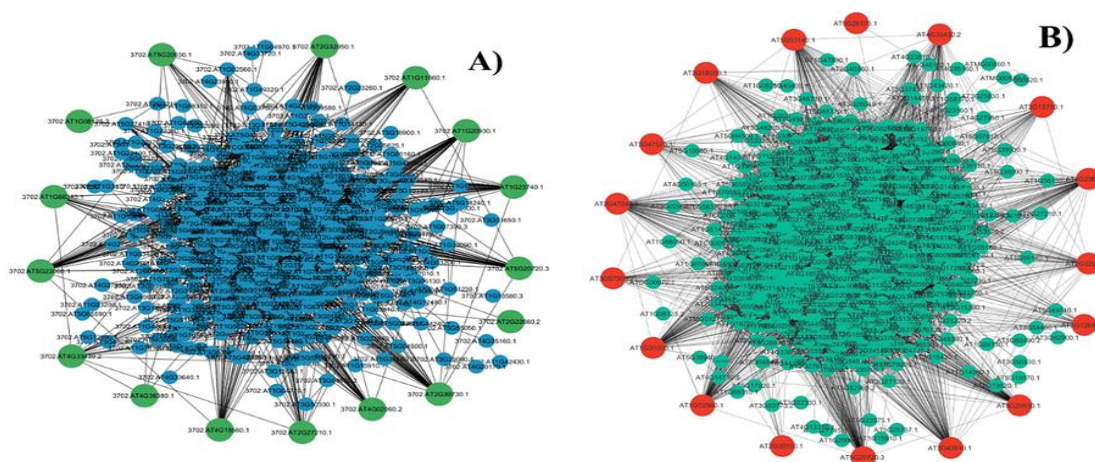
<sup>۵</sup> در مباحث هستی‌شناسی ژن (Gene Ontology; GO)، این عبارت به مکان‌های زیرسلولی (Subcellular locations) اطلاق می‌شود که یک پروتئین در آنجا فعالیت می‌کند.

مشخص شد که ۲۱٪ از ژن‌های شناسایی شده در این دو روش مشترک هستند. با ترکیب ژن‌های شناسایی شده از هر دو روش و حذف تکراری‌ها، ۷۵۸ ژن منحصربه‌فرد به دست آمد که به عنوان ورودی به پایگاه‌داده‌های STRING و GeneMANIA داده شدند تا شبکه‌های برهمکنش پروتئینی (PPI) و تنظیم ژنی (GRN) بازسازی و تجزیه شوند. توالی پروتئینی و Uniprot\_id ژن استخراج شده از پایگاه داده Uniprot وارد پایگاه داده STRING (<https://string-db.org/>) شد و در نهایت، شبکه برهمکنش پروتئینی (PPI) مرتبط با این ژن‌ها در *آرابیدوپسیس تالیانا* رسم گردید (شکل ۳). پایگاه داده STRING شامل مقادیر برهمکنش پروتئینی (PPI) تجربی، پیش‌بینی شده، انتقال یافته و متنی است. هر تعامل در STRING دارای یک نمره ترکیبی بین ۰ تا ۱ است، به طوری که نمرات بالاتر نشان‌دهنده تعاملات قوی‌تر هستند (Mering et al., 2003). در شبکه PPI ترسیم شده، ۷۴۸ گره و ۲۸۶۵ یال (edge) وجود دارد و اغلب گره‌ها دارای ۰ تا ۵ یال بوده و اکثریت آنها دارای ۰ تا ۲۵ ورودی و ۰ تا ۵ یال خروجی هستند که نشان‌دهنده برهمکنش و تنظیم فعالیت پروتئین‌های دیگر است. برای بازسازی شبکه تنظیم ژنی (GRN)، Gene id ۷۵۸ ژن اوتولوگ از ترکیب داده‌های تجزیه‌های ژنوم پایه و سرهم‌بندی نوپدید وارد پلتفرم آنالیز GeneMANIA (<https://genemania.org/>) شد و شبکه تنظیم ژنی مرتبط با این ژن‌ها بر اساس داده‌های *آرابیدوپسیس تالیانا* رسم گردید. در این شبکه، ۷۶۶ گره و ۲۰۸۸۹ یال وجود دارد و اغلب گره‌ها دارای ۵۰ تا ۵۵ یال بوده و اکثریت آنها دارای ۲۵ تا ۳۰ ورودی و ۰ تا ۱۰ یال خروجی هستند که نشان‌دهنده برهمکنش و تنظیم فعالیت محصولات ژن‌های دیگر است. شبکه‌های PPI و GRN بازسازی شده از لحاظ پارامترهای توزیع درجه و مرکزیت میانی (Betweenness centrality) بررسی شدند و نتایج نشان داد که توزیع درجه هر دو شبکه GRN و PPI بدون مقیاس بوده و از قانون توان تبعیت می‌کنند، به این معنا که تعداد کمی از ژن‌ها توسط تعداد زیادی ژن دیگر تنظیم می‌شوند، در حالی که اکثر ژن‌ها تنها توسط تعداد کمی ژن دیگر تنظیم می‌شوند. همچنین، مشخص شد که با افزایش مقدار درجه و تعداد ارتباطات یک گره در شبکه‌های GRN و PPI، خاصیت مرکزیت میانی آن نیز افزایش می‌یابد و هرچه یک گره بیشتر به عنوان قسمتی از کوتاه‌ترین مسیرهای یک گراف استفاده شود، نقش مهم‌تری در گراف ایفا می‌کند. مرکزیت میانی نشان‌دهنده تعداد کوتاه‌ترین مسیرهای بین هر دو گره گراف است که از این گره عبور می‌کنند و معیاری برای نشان دادن اهمیت یک گره در گراف است. تجزیه توپولوژی، شبکه‌های GRN و PPI بازسازی شده از طریق ۱۱ الگوریتم محاسباتی افزونه Cytohubba (Str, BC, CC, Rad, Clo, EC, BN, RAD, MCC, DMNC, MNC, EPC, Deg) انجام شد. این ژن‌های هاب با حذف تکرارها شامل: *MCM7, AOR, 20cpn, BSL3, GRDP1, CAS, CDKB2;2, HSP70, GER3, ETR1, BAK1*، *PP2C76, COPI, WRKY50, Lac1, CDPK6, C3H37, P45090C1, RCA, AdoMet-MTases, DXS, Clp5, LUT5, LACS, LRR-RLK, PPR, Histone H1-3, CaM-7* بودند. در جدول ۲ و ۳ مشخصات ژن‌های هاب به همراه میزان بیان، P-value و الگوریتمی که توسط آن شناسایی شده اند ذکر شده است. سپس در ادامه کارکرد ژن‌های هاب به دست آمده از طریق تجزیه راه‌انداز و مطالعات مولکولی پیشین مورد بررسی شدند.

### تجزیه عناصر تنظیم کننده سیس المنت (Cis regulatory elements) در راه‌انداز ژن‌های هاب: به منظور

بررسی دقیق نواحی پرموتری ژن‌های هاب و شناسایی الگوهای تنظیمی مؤثر در پاسخ‌دهی آن‌ها، تجزیه و تحلیل عناصر تنظیم کننده Cis با استفاده از ابزار آنالیز PLANTcare انجام شد. نتایج این آنالیز نشان داد که پرموترها حاوی طیف وسیعی از

موتیف‌های عملکردی هستند که در فرآیندهای مختلف از جمله پاسخ به هورمون‌ها، تنش‌های زیستی و غیرزیستی، رشد و نمو و همچنین تنظیم نور و... نقش دارند. در ادامه جزئیات مربوط به نوع موتیف‌ها و فراوانی آن‌ها ارائه می‌شود.



شکل ۳. A) شبکه برهمکنش پروتئینی (PPI) و B) شبکه تنظیم ژنی (GRN) مربوط به ترکیب ژن‌های با اختلاف بیان معنی‌دار (DEGs) حاصل از راهبرد تجزیه ژنوم پایه و سرهم‌بندی نوپدید. آبی در شبکه PP و سبز در شبکه GRN ژن‌های معمولی و گره‌های قرمز سبز در شبکه PPI و قرمز در شبکه GRN، ژن‌های هاب هستند

Figure 3. A) Protein interaction network (PPI) and B) gene regulation network (GRN) related to the composition of genes with significant expression differences (DEGs) resulting from the strategy of genome-based analysis and *de novo* assembly. Blue in the PP network and green in the GRN network are common genes, and red, green nodes in the PPI network and red in the GRN network are hub genes

جدول ۲. نتایج تجزیه توپولوژیک شبکه برهمکنش پروتئینی و لیست ژن‌های هاب شناسایی شده

Table 2. The results of topological analysis of the protein interaction network and the list of identified hub genes

| پروتئین‌های هاب<br>Hub-proteins | شناسه ژن<br>Gene ID<br>ID name | منبع<br>Source | لگاریتم در پایه ۲ چند برابر<br>تغییرات<br>Log2FC | سطح احتمال تصحیح شده<br>P-adj | الگوریتم انتخاب<br>Selecting<br>algorithm |
|---------------------------------|--------------------------------|----------------|--|-------------------------------|---|
| <i>BAK1</i>                     | At4g33430                      | <i>de novo</i> | 7.6666335834481                                  | 0.0168223600413336            | BC, BN                                    |
| <i>ETR 1</i>                    | At1g66340                      | <i>de novo</i> | 6.94006354059085                                 | 0.0236870664082761            | BC, BN                                    |
| <i>GER3</i>                     | At5g20630                      | <i>de novo</i> | 11.5703649325249                                 | 0.0127211506581168            | BC, BN,                                   |
| <i>COP1</i>                     | At2g32950                      | <i>de novo</i> | 5.75643724866479                                 | 0.0250520613056835            | BC, BN,                                   |
| <i>HSP70kDa16</i>               | At1g11660                      | <i>de novo</i> | 8.44099236821043                                 | 0.0169477484398769            | BC, BN                                    |
| <i>CDKB2;2</i>                  | At1g20930                      | Ref            | 2.11012805339213                                 | 0.0043274127685269            | BC, EC,                                   |
| <i>AOR</i>                      | At1g23740                      | <i>de novo</i> | 10.2706534682481                                 | 0.0133540837608161            | Deg, Str                                  |
| <i>CAS</i>                      | At5g23060                      | <i>de novo</i> | 9.074912502268                                   | 0.0159287315992068            | Deg                                       |
| <i>GRDP1</i>                    | At2g22660                      | <i>de novo</i> | 6.79000737353101                                 | 0.0243871081066933            | CC  |
| <i>BSL3</i>                     | At2g27210                      | <i>de novo</i> | -7.850   | 0.0168129888173991            | EC  |
| <i>CPN20</i>                    | At5g20720                      | <i>de novo</i> | 7.92720118204755                                 | 0.0239137598891815            | BN, Clo,                                  |
| <i>RCA</i>                      | At2g39730                      | <i>de novo</i> | 9.28615148738066                                 | 0.0135256358884221            | BC, Clo,                                  |
| <i>MCM7</i>                     | At4g02060                      | <i>de novo</i> | 7.90362946964894                                 | 0.0210901888837111            | Deg                                       |
| <i>DXS</i>                      | At4g15560                      | <i>de novo</i> | 8.729482184496                                   | 0.0145050403164837            | BC  |
| <i>S-AdoMet</i>                 | At1g08125                      | <i>de novo</i> | 9.0758777892288                                  | 0.013622052734566             | CC  |
| <i>CYP90C1</i>                  | At4g36380                      | <i>de novo</i> | 6.51533798166961                                 | 0.0268212334237204            | EC  |

Ref Geno; Reference genome

نتایج نشان داد که راهانداز ژن‌های هاب شامل موتیف‌های مختلفی مانند ABRE, ABRE3a, ABRE4, AT~ABRE, AuxRR-core, CGTCA-motif, ERE, GARE-motif, P-box, TATC-box, TCA-element, box S, W box, WRE3, TGA-box, TGA-element, TGACG-motif برای پاسخ‌دهی به هورمون‌های گیاهی، MYB recognition site, MYB-like sequence, Myb-binding site, WUN-motif برای تنش‌های زیستی، Myb, MYB, Myc, MYC, DRE core, TC-rich repeats, STRE, MBSI, MBS, LTR, DRE1, CCAAT-CCGTCC-box, as-1, RY-element, AAGAA-box, ARE, AT-rich element motif, re2f-1, O2-site, HD-Zip 1, F-box, E2Fb, dOCT, CAT-box, GCN4\_motif, CARE, AC-I, ATC-motif, Box II, ACE, GA-motif, Box 4, GATA-motif, chs-CMA1a, circadian برای رشد و نمو، chs-CMA2a, AE-box, G-Box, G-box, MRE, ATCT-motif, L-box, TCCC-motif, Sp1, GT1-motif, H-box, I-box, Gap-box, LAMP-element, GTGGC-motif, TCT-motif, AAAC-motif, chs-Unit 1 TATA-box, CAAT-box, A-box, AT~TATA-motif و m1, C-box, 3-AF3 binding site برای پاسخ‌دهی به نور و TATA, Unnamed\_\_1 به عنوان موتیف‌های مرکزی TATA است.

جدول ۳. نتایج تجزیه توپولوژیک شبکه تنظیم ژنی و لیست ژن‌های هاب شناسایی شده

Table 3. The results of topological analysis of the gene regulation network and the list of identified hub genes

| ژن‌های هاب<br>Hub-genes | نام ژن<br>Gene name | منبع<br>Source | لگاریتم در پایه ۲ چند برابر تغییرات<br>Log2FChange | سطح احتمال تصحیح شده<br>P-adj | الگوریتم انتخاب<br>Selecting algorithm |
|-------------------------|---------------------|----------------|--|-------------------------------|--|
| <i>C3H37</i>            | At3g12680           | <i>de</i>      | -10.01569  | 0.0131629996746296            | EC                                     |
| <i>CDPK6</i>            | At4g23650           | <i>de</i>      | 6.38288560324252                                   | 0.0298082734468044            | Str                                    |
| <i>GLB1</i>             | At3g13750           | -----          | -----  | -----                         | EC                                     |
| <i>WRKY50</i>           | At5g26170           | Ref            | -2.635139  | 0.0194630980746961            | CC                                     |
| <i>BAK1</i>             | At4g33430           | <i>de</i>      | 7.6666335834481                                    | 0.0168223600413336            | BN,                                    |
| <i>COP1</i>             | At2g32950           | <i>de</i>      | 5.75643724866479                                   | 0.0250520613056835            | BC, Deg                                |
| <i>PP2C76</i>           | At5g53140           | <i>de</i>      | -8.831375  | 0.0159287315992068            | BC, BN, Str                            |
| <i>CaM-7</i>            | At3g43810           | <i>de</i>      | 9.15541689085822                                   | 0.0136800611640202            | BC, Deg, BC, Str                       |
| <i>GER3</i>             | At5g20630           | <i>de</i>      | 11.5703649325249                                   | 0.0127211506581168            | BC, BN, Deg                            |
| <i>H1-3</i>             | At2g18050           | <i>de</i>      | 7.5760753254851                                    | 0.0206557893618669            | EC                                     |
| <i>PPR</i>              | At2g30100           | <i>de</i>      | 8.29665724271838                                   | 0.0169477484398769            | CC, DMNC                               |
| <i>LRR</i>              | At3g47570           | <i>de</i>      | -10.12854  | 0.0128503815526108            | BN                                     |
| <i>INO80</i>            | At3g57300           | <i>de</i>      | 7.52820885719429                                   | 0.0217662781318568            | BC, EC, Str                            |
| <i>LAC1</i>             | At2g47240           | Ref            | 2.69918688755558                                   | 0.00054617940317e-            | Deg, Clo, BN,                          |
| <i>CPN20</i>            | AT5G20720           | <i>de</i>      | 7.92720118204755                                   | 0.0239137598891815            | Deg                                    |
| <i>ClpP5</i>            | At1g02560           | <i>de</i>      | 6.66567258834335                                   | 0.0260420557735709            | Deg, MNC, Rad,                         |
| <i>LUTEIN</i>           | At1g31800           | <i>de</i>      | 7.94501445337288                                   | 0.0176800789636328            | Deg                                    |

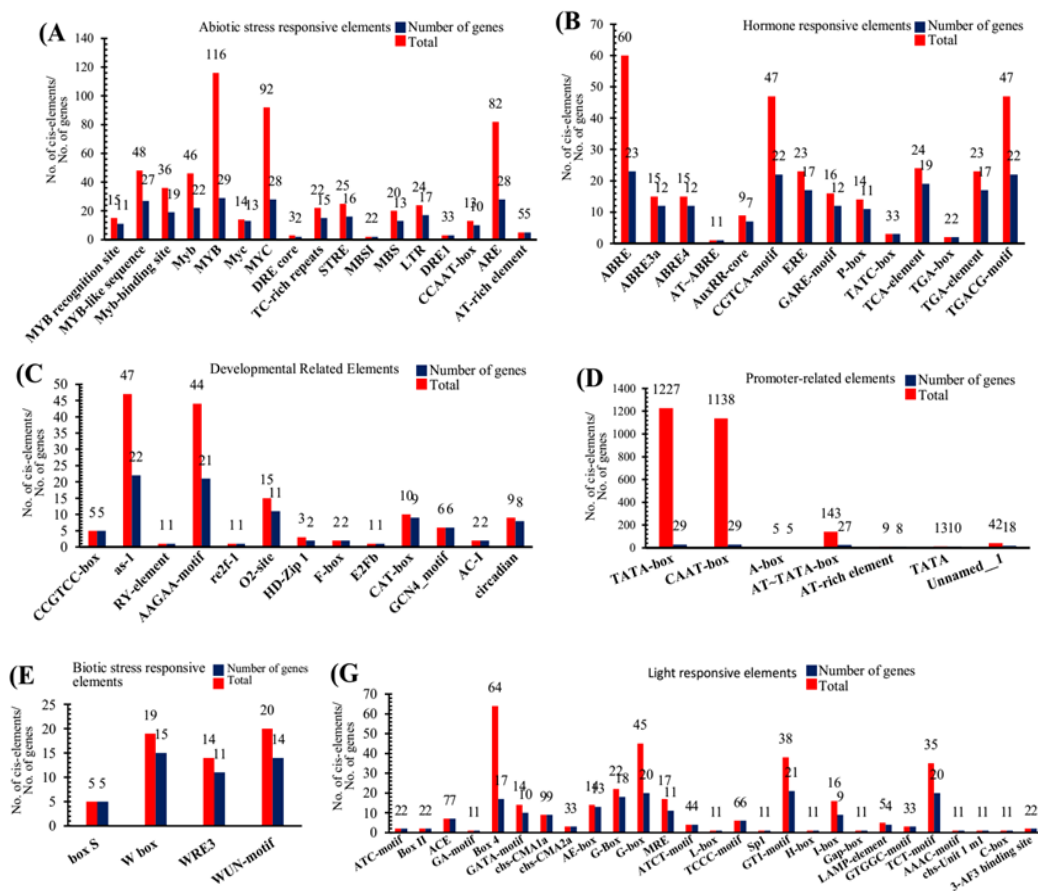
Ref Geno; Reference genome

در ادامه، در جدول ۴ و شکل ۴ تعداد موتیف‌های دسته‌بندی شده و توصیف موتیف‌های کلیدی پاسخ‌دهنده به تنش‌های غیرزیستی بررسی می‌شود. این بخش ابتدا تعداد موتیف‌ها را در دسته‌های مختلف (مانند هورمون‌ها، تنش‌های زیستی و غیرزیستی، رشد، نور و موتیف‌های مرکزی) ذکر می‌کند و سپس بر مهم‌ترین موتیف‌های مرتبط با تنش‌های غیرزیستی مانند ABRE, ERE, MYB, W-box و MBS, CGTCA-motif همراه با درصد حضور آن‌ها و نقش‌هایشان در پاسخ به عوامل محیطی مانند خشکی، شوری و هورمون‌ها تمرکز دارد.

جدول ۴. دسته‌بندی عناصر تنظیم‌کننده سیس در پرموتور ژن‌های هاب بر اساس عملکرد

Table 4. Classification of cis-regulatory elements in the promoter of hub genes based on function

| توضیحات مختصر<br>Brief description   | درصد حضور عناصر مهم<br>Percentage of presence of key elements | تعداد کل موتیف‌ها<br>Total number of motifs | عناصر سیس (موتیف‌ها)<br>Cis elements (Motifs)  | دسته‌بندی<br>Category                                  |
|--|---|---|--|--|
| مرتبط با پاسخ به هورمون‌هایی مانند آبسیزیک اسید، اتیلن، اکسین، جیبرلین و متیل جاسمونات<br>Related to the response to hormones such as abscisic acid (ABA), ethylene, auxin, gibberellin, and methyl jasmonate (MeJA)   | ABRE: 79 %, ERE: 58%, CGTCA-motif: 75%                        | 299   | ABRE, ABRE3a, ABRE4, AT~ABRE, AuxRR-core, CGTCA-motif, ERE, GARE-motif, P-box, TATC-box, TCA-element, TGA-box, TGA-element, TGACG-motif  | پاسخ‌دهی به هورمون‌های گیاهی<br>Plant hormone response |
| مرتبط با پاسخ به عوامل بیماری‌زا و تنش‌های زیستی مانند پاتوژن‌ها (عوامل بیماری‌زا)<br>Related to the response to biotic stresses and pathogens   | W-box: 51%  | 58  | box S, W box, WRE3, WUN-motif  | تنش‌های زیستی<br>Biotic stress                         |
| مرتبط با پاسخ به تنش‌هایی مانند خشکی، شوری، دمای پایین و آزدایی؛ شامل عناصری برای اتصال فاکتورهای رونویسی مانند MYC و MYB<br>Associated with responses to stresses such as drought, salinity, low temperature, and dehydration; including binding elements for transcription factors such as MYB and MYC | MBS: 44 %, MYB: 100%, MYC: 96%                                | 58  | MYB recognition site, MYB-like sequence, Myb-binding site, Myb, MYB, Myc, MYC, DRE core, TC-rich repeats, STRE, MBSI, MBS, LTR, DRE1, CCAAT-box, ARE, AT-rich element  | تنش‌های غیرزیستی<br>Abiotic stress                     |
| مرتبط با فرآیندهای رشد، نمو و متابولیسم گیاهی مانند تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با چرخه سلولی و متابولیسم نیتروژن<br>Associated with plant growth, development, and metabolic processes, such as the regulation of gene expression involved in the cell cycle and nitrogen metabolism                        | N/A   | 566   | CCGTCC-box, as-1, RY-element, AAGAA-motif, re2f-1, O2-site, HD-Zip 1, F-box, E2Fb, dOCT, CAT-box, GCN4_motif, CARE, AC-I, circadian  | رشد و نمو<br>Growth and development                    |
| مرتبط با پاسخ به سیگنال‌های نوری، فتوسنتز و تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با کلروفیل و فیتوکروم.<br>Associated with light signal response, photosynthesis, and the regulation of gene expression related to chlorophyll and phytochromes   | N/A   | 146   | ATC-motif, Box II, ACE, GA-motif, Box 4, GATA-motif, chs-CMA1a, chs-CMA2a, AE-box, G-Box, G-box, MRE, ATCT-motif, L-box, TCCC-motif, Sp1, GT1-motif, H-box, I-box, Gap-box, LAMP-element, GTGGC-motif, TCT-motif, AAAC-motif, chs-Unit 1 m1, C-box, 3-AF3 binding site | پاسخ‌دهی به نور<br>Light response                      |
| عناصر پایه‌ای برای شروع رونویسی، مانند پرموتورهای مرکزی و عناصر غنی از AT<br>Basal elements for transcription initiation, such as core promoters and AT-rich elements  | N/A   | 316   | TATA-box, CAAT-box, A-box, AT~TATA-box, AT-rich element, TATA, Unnamed__1  | موتیف‌های مرکزی<br>Core motifs                         |



شکل ۴. (A) نمودار تعداد عناصر تنظیم کننده مرتبط با تنش های غیر زیستی، (B) نمودار تعداد عناصر تنظیم کننده مرتبط با واکنش های هورمونی (C) نمودار تعداد عناصر تنظیم کننده مرتبط با رشد و نمو، (D) نمودار تعداد عناصر تنظیم کننده مرتبط با راه انداز، (E) نمودار تعداد عناصر تنظیم کننده مرتبط با تنش های زیستی، (G) نمودار تعداد عناصر تنظیم کننده مرتبط با واکنش به نور، پیش بینی شده در پروموتورهای ژن های هاب. تعداد کل عناصر شناسایی شده در راه انداز ژن های هاب (Total)، تعداد ژن هایی که محل اتصال این فاکتورهای رونویسی را در راه انداز خود دارند (Number of genes)

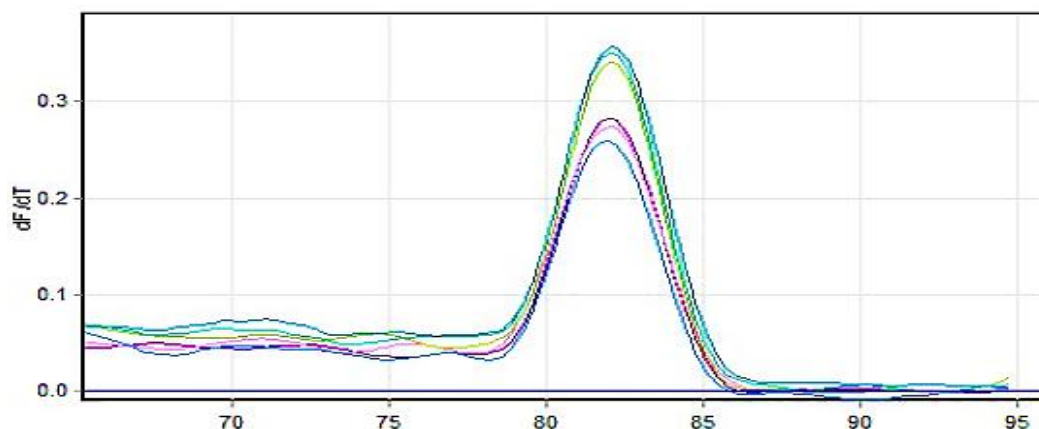
Figure 4. (A) A diagram of the number of regulatory elements related to abiotic stress, (B) a diagram of the number of regulatory elements related to biotic stress, (C) a diagram of the number of regulatory elements related to growth and development, (D) a diagram of the number of regulatory elements related to promoter, (E) diagram of the number of regulatory elements related to biotic stress, (G) diagram of the number of regulatory elements related to light response, predicted in the promoters of hub genes. The total number of elements identified in the hub genes (Total), the number of genes where they have the binding site of this transcription factors in their promoters (number of genes)

همچنین، موتیف های GT-1 برای پاسخ به شوری، TGA-element/box برای پاسخ به اکسین و GARE-motif/P-box برای پاسخ به جیبرلین نیز از موتیف های مهم برای ژن های پاسخ دهنده به تنش های غیرزیستی هستند. حضور تمامی این عناصر در درصد بالایی از توالی راه اندازهای ژن های هاب، نقش مهم آن ها در تنش های زیستی و غیرزیستی را تأیید می کند و آن ها

را به گزینه‌های مناسبی برای طراحی راه‌انداز و مهندسی ژنتیک جهت تقویت شبکه دفاعی در مقابل تنش‌های غیرزیستی تبدیل می‌کند.

### سنجش تغییرات بیان ژن هاب *COPI* E3 ubiquitin-protein ligase با استفاده از Real-Time

PCR: در واکنش Real-Time PCR کمیت نسبی توسط اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنس، در نتیجه اتصال رنگ توسط نرم‌افزار Rotor-Gene Q انجام شد. بعد از پایان واکنش‌ها مقدار حد آستانه (Threshold) طوری در نظر گرفته شد که سیگنال‌های فلورسنت را در فاز نمایی واکنش قطع نماید. بعد از به دست آوردن CT و مقدار بیان نسبی ژن‌های مطالعه شده با روش  $\Delta\Delta CT$  محاسبه شد (Pfaffl, 2001). در آخر هم داده‌های حاصل با نرم‌افزار SAS تجزیه و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون t-student و در سطح احتمال ۵٪ صورت گرفت. نتایج نشان داد که: بیان نسبی ژن E3 ubiquitin-protein ligase *COPI* (At2g32950) با روش  $\Delta\Delta CT$  برابر است با  $FoldChange = 2.75$  که بیان‌کننده افزایش ۲/۷۵ بیان این ژن شرایط ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش شوری  $8 ds.m^{-1}$  می‌باشد، تجزیه‌های آماری نشان از معنی‌دار بودن تغییرات بیان این ژن در سطح ۰/۰۵ بود.



شکل ۵. منحنی‌های ذوب نمونه‌های بررسی شده ژن *COPI* E3 ubiquitin-protein ligase (At2g32950) در واکنش Real-Time PCR

Figure 5. Melting curves of examined samples of E3 ubiquitin-protein ligase *COPI* gene (At2g32950) in Real-Time PCR reaction

### نتایج هستی‌شناسی ژن‌های هاب در شبکه‌های GRN و PPI تحت تنش شوری: نتایج هستی‌شناسی

ژن‌های هاب در شبکه‌های GRN (شبکه‌های تنظیم‌کننده ژن) و PPI (شبکه‌های تعامل پروتئین-پروتئین) تحت تنش شوری، نقش‌های متنوع این ژن‌ها را در مکانیسم‌های مقاومت گیاهی برجسته می‌کند. برخی از این ژن‌ها نقش کلیدی مستقیم در پاسخ به تنش دارند، در حالی که دیگران به‌طور غیرمستقیم از طریق تنظیم فرآیندهای سلولی و متابولیسم حمایت می‌کنند. این تحلیل نشان می‌دهد که ژن‌های هاب در هماهنگی پاسخ‌های گیاهی به شوری، از جمله تنظیم هورمون‌ها، سیگنالینگ، و حفظ تعادل سلولی، مؤثر هستند. این ژن‌ها به ۶ دسته اصلی شده‌اند که شامل مسیره‌های هورمونی، سیگنالینگ کلسیم، تنظیم رونویسی، حفظ ساختار پروتئین، فعال‌سازی روبیسکو و حفظ فشار اسمزی می‌شوند. این دسته‌بندی‌ها نه تنها مکانیسم‌های دفاعی گیاه در برابر تنش شوری را نشان می‌دهد، بلکه پتانسیل این ژن‌ها را برای کاربردهای مهندسی ژنتیک در بهبود مقاومت گیاهان برجسته می‌سازد. جزئیات

این دسته‌بندی‌ها در جدول ۵ خلاصه شده است. همچنین در ادامه نقش هر کدام از دسته‌های ژن‌های هاب در مسیرهای مختلف درگیر در تنش شوری بررسی می‌شود.

جدول ۵. دسته‌بندی ژن‌های هاب بر اساس نقش در مقاومت به تنش شوری

Table 5. Classification of hub genes based on their role in salt stress resistance

| نقش اصلی در پاسخ به تنش شوری<br>Main role in salt stress response  | ژن‌های هاب شناسایی شده<br>Identified hub genes                                       | دسته عملکردی<br>Functional category  |
|--|--|--|
| تنظیم مسیرهای ABA، براسینوسترئوئید و اتیلین در پاسخ به تنش<br>Regulation of ABA, brassinosteroid, and ethylene pathways in response to stress  | <i>COPI1, CPN20, PP2CA, GRDP1, DXS, CYP90C1, BAK1, BSL3, LRR-RLK, ETR1, s-AdoMet</i> | بیوسنتز و پیام‌رسانی هورمونی و احساس تنش و محرک بیرونی<br>Hormonal biosynthesis and signaling, and the perception of stress and external stimuli   |
| پاسخ سریع کلسیمی و سیگنالینگ کلسیم برای باز و بسته شدن روزنه‌ها<br>Rapid calcium transients and calcium signaling for stomatal opening and closure   | <i>CAM7, CDPK6, CAS</i>  | مسیر علامت‌دهی کلسیم در پاسخ به تنش شوری و کنترل روزنه‌ها<br>Calcium signaling pathway in response to salinity stress and stomatal control   |
| کنترل بیان ژن در سطوح DNA و RNA، پردازش RNA<br>Control of gene expression at DNA and RNA levels, and RNA processing  | <i>MCM2-7, H1.3, WRKY50, C3H37</i>   | تنظیم در سطح همانندسازی، رونویسی و پردازش پس از رونویسی RNA<br>Regulation at the levels of replication, transcription, and post-transcriptional RNA processing                             |
| حفاظت از پروتئین‌ها و غشاها در شرایط تنش و بازآرایی آن‌ها<br>Protection of proteins and membranes under stress conditions and their reconfiguration  | <i>HSP70, ClpP</i>   | حفظ ساختار پروتئین‌ها و غشاها و تجدید پروتئین‌ها تحت تنش<br>Maintenance of protein and membrane integrity under stress   |
| فعال‌سازی روبیسکو، حفظ فتوسنتز و جلوگیری از اکسیداسیون در کلروپلاست<br>Rubisco activation, maintenance of photosynthesis, and prevention of oxidation in the chloroplast                       | <i>LUT1, AOR, RCA</i>  | ساخت و فعال‌سازی روبیسکو، حفاظت و سهم‌زدایی کلروپلاست<br>Rubisco assembly and activation, chloroplast protection and detoxification  |
| تولید موم کوتیکولی، تجزیه پلی‌ساکاریدهای دیواره و تولید قند فعال جهت حفظ آب<br>Cuticular wax production, cell wall polysaccharide degradation, and active sugar production for water retention | <i>BGAL, LACSI</i>   | کاهش تعرق و حفظ فشار اسمزی از طریق تولید موم و تجزیه پلی‌ساکاریدها<br>Reduction of transpiration and maintenance of osmotic pressure through wax production and polysaccharide degradation |

ایزوپرنوئیدها ترکیبات آلی با نقش‌های متنوعی در تنفس، فتوسنتز و تنظیم رشد هستند. پیش‌سازهای <sup>۶</sup>IPP و <sup>۷</sup>DMAPP

در پلاستیدها از طریق مسیر <sup>۸</sup>MEP تولید می‌شوند و آنزیم کلیدی *DXS* نقش اصلی در این مسیر دارد (Rodríguez-)

<sup>6</sup> 5-Carbon units isopentenyl diphosphate

<sup>7</sup> Dimethylallyl diphosphate

<sup>8</sup> 4-Phosphate methylerythritol

ایزوپرنوئیدها مانند Volatiles (مونوترپن‌ها، دی‌ترپن‌ها، ایزوپرن‌ها، هورمون‌ها (جیبرلین‌ها، سیتوکینین‌ها، اسید آبسزیک، استریگولاکتون‌ها) و ترکیبات مرتبط با فتوسنتز (کاروتنوئیدها، کلروفیل؛ توکوفرول‌ها، پرنیل کوئینون‌ها) استفاده می‌شوند. مسیر MEP و آنزیم‌های آن در تولید پیش‌سازها و سنتز ایزوپرنوئیدهای گیاهی نقش کلیدی دارند (Xiang et al., 2013). اولین گام در مسیر MEP که توسط آنزیم دی‌اکسی‌زایلوز ۵-فسفات (*DXP*) سنتتاز (*DXS*) Deoxyxylulose 5- / (*DXS*) phosphate(*DXP*) synthesis (*DXS*)، تشکیل *DXP* از پیرووات و گلیسرآلدئید ۳-فسفات کاتالیز می‌شود. در واکنش دوم مسیر MEP، آنزیم *DXR* (DXP reductoisomerase)، ماده *MEP* (Methylerythritol 4-phosphat) را با یک بازآرایی درون مولکولی و کاهش *DXP* deoxyxylulose 5-phosphate سنتز می‌کند. سپس، پنج آنزیم دیگر *MEP* (اولین واسطه‌ای که مختص این مسیر است) را به Isopentenyl pyrophosphate (IPP) و Dimethylallyl (*DMAPP*) pyrophosphate تبدیل می‌کنند (شکل ۶) (Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002; Rodríguez-Concepción & Boronat, 2015). پس از سنتز ABA از طریق مسیر MEP، در تنش شوری، *SnRK2s* و *PP2Cs* نقش کلیدی در تنظیم ABA دارند. گیرنده‌های ABA مانند *PYR/PYLs* پس از حس کردن ABA، آنزیم *PP2Cs* را سرکوب کرده و اثر بازدارندگی آن‌ها بر *OST1*<sup>۱۱</sup> برداشته شده و همچنین *SnRK2* را فعال می‌کنند (Xie et al., 2012). *SnRK2s* فاکتورهای رونویسی *ABFs*<sup>۱۲</sup> و *ABIs*<sup>۱۳</sup> را فسفریله کرده و ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش را تنظیم می‌کنند (Soon et al., 2012). *OST1* فعال شده، NADPH اکسیداز و کانال‌های آنیونی را فسفریله می‌کند و باعث تجمع ROS در سلول‌های نگهبان می‌شود که مسیرهای پاسخ به ABA را فعال می‌کند. فسفوریلاسیون با واسطه *OST1*، اهداف پایین‌دست، از جمله NADPH اکسیداز موجود غشای پلاسمایی و کانال‌های  $Ca^{2+}$  را فسفریله می‌کند و باعث تجمع پیام‌رسان‌های دوم مانند گونه‌های اکسیژن فعال ROS و  $Ca^{2+}$  در سلول‌های نگهبان می‌شود. این پیام‌رسان‌های دوم مسیرهای علامت‌دهی منتهی به پاسخ‌های فیزیولوژیکی به ABA را فعال می‌کنند (Kim et al., 2010; Kollist et al., 2014; Zhang et al., 2014). علاوه بر این، فسفوریلاسیون با واسطه *OST1*، کانال R- و S-type slow anion channel-associated 1 (*SLAC1*)، کانال type quickly-activating anion channel 1 (*QUAC1*) را فعال می‌کند اما کانال یکسو کننده  $K^{+}$  به سمت داخل  $Ca^{2+}$  inward rectifying channel (*KATI*) را غیرفعال می‌کند. این رویدادهای فسفوریلاسیون باعث خروج انبوه آنیون‌های  $Cl^{-}$  و  $NO_3^{-}$  از سلول‌های محافظ می‌شوند، در حالی که هجوم  $K^{+}$  به محافظ را مهار می‌کنند. در نتیجه، فشار تورگور سلول‌های محافظ کاهش می‌یابد و روزنه‌ها بسته می‌شوند (شکل ۶) (Lee et al., 2009; Sato et al., 2009; Kim et al., 2010). *COPI*<sup>۱۴</sup> یک لیگاز یوبیکوئیتین E3 است که از یک دامنه RING، یک دامنه مارپیچ پیچ‌خورده و یک دامنه *WD40* تشکیل شده است و واسطه یوبی کوئیتیناسیون و تخریب چندین فاکتور تنظیمی در فتومورفوژنز گیاه است. در شرایط وجود نور، *COPI* از هسته به سیتوزول صادر می‌شود. که منجر به تجمع این فاکتورهای رونویسی و ترویج فتومورفوژنز می‌شود. در دهه‌های گذشته، کارکرد *COPI* در علامت‌دهی نور بوده است. مطالعات گسترده و شواهد نشان داده است که *COPI* در گلدهی، ریتم

<sup>9</sup> Probable protein phosphatase 2C 76

<sup>10</sup> PYRABACTIN RESISTANCE/PYR-LIKE

<sup>11</sup> PP2Cs-Open stomata 1

<sup>12</sup> ABSCISIC BINDING FACTORS

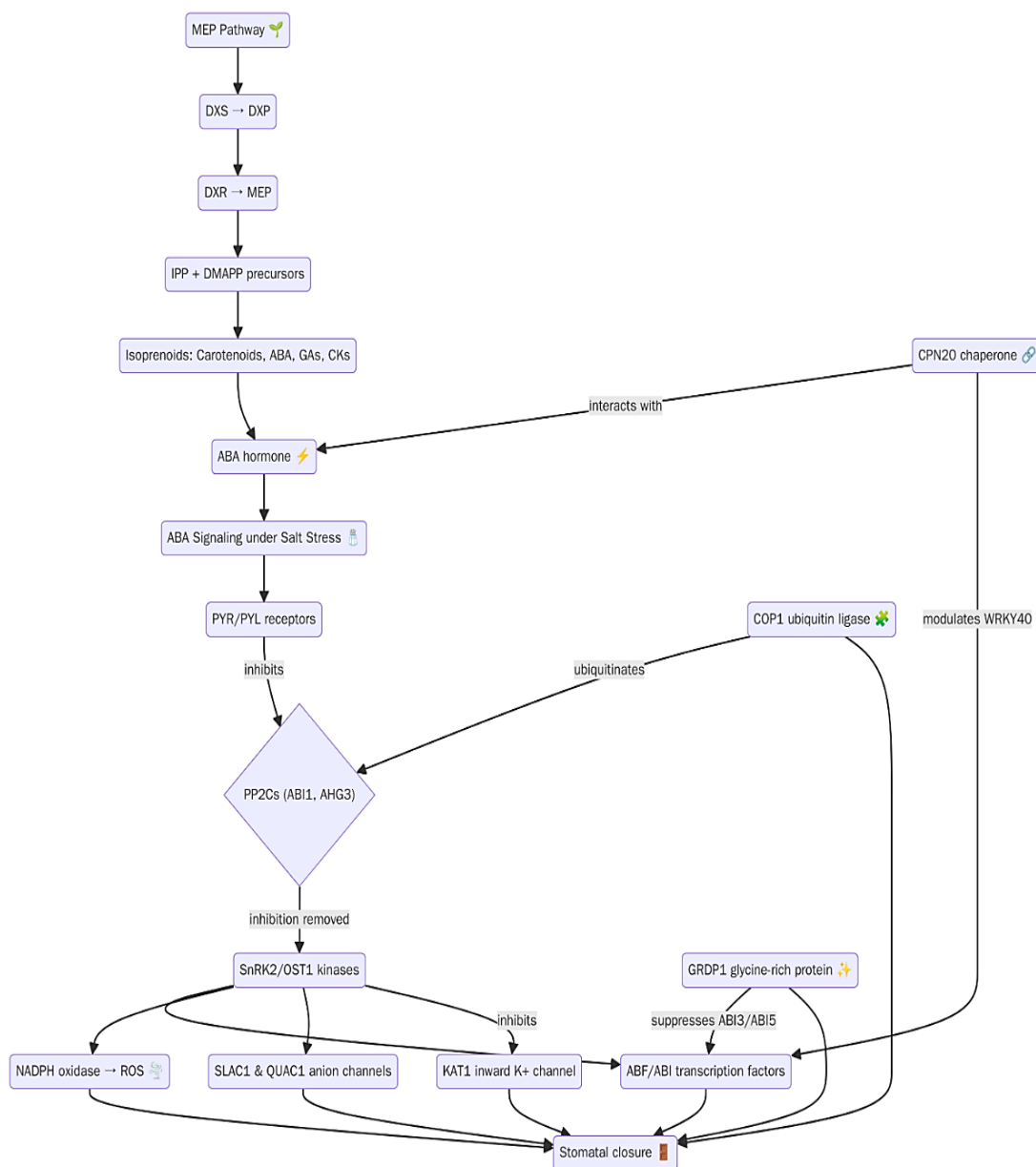
<sup>13</sup> ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENT

<sup>14</sup> E3 ubiquitin-protein ligase COP1

ساعت زیستی، دفاع از ویروس، سیگنال دهی هورمون گیاهی، رشد و بسته شدن روزنه و سایر فرآیندهای زیستی دخیل است (Mao et al., 2005; Kang et al., 2009; Wang et al., 2019). در مطالعه‌ای نشان داده شد که *COPI* در بسته شدن روزنه با واسطه ABA نقش دارد و تجزیه و تحلیل ژنتیکی نشان می‌دهد که *COPI* حرکت روزنه را در بالادست با تخریب تنظیم کننده‌های علامت‌دهی ABA یعنی Clade A *PP2Cs* کنترل می‌کند. نشان داده شد که *COPI*، *AHG3*، *PP2Cs*، *ABI/HAB* را یوبیکوئیتینه می‌کند و باعث تخریب آن‌ها می‌شود. یوبیکوئیتینه کردن *PP2C* توسط *COPI* در حضور ABA افزایش می‌یابد و تخریب عوامل کلیدی علامت‌دهی ABA، Clade A *PP2Cs* یک مسیر جدید در تعدیل بسته شدن روزنه ارائه می‌دهد. احتمالاً *COPI* حتی در غیاب تنش نقش‌های در مدولاسیون دینامیکی و هموستاز گیرنده‌های مشترک کلاسه *PP2C A* در سلول دارد، زیرا برای تعامل با *ABI1* و *AHG3* و Ubiquitination بعدی آن‌ها نیازی به حضور ABA ندارد. با این وجود، ABA ارتباط *COPI* را با این دو بستر بسیار افزایش می‌دهد و Ubiquitination، دو مولکول *AHG3* و *ABI1* توسط *COPI* را افزایش می‌دهد و آن را به پاسخ تنش مرتبط می‌کند (شکل ۶) (Mao et al., 2005; Kang et al., 2009; Wang et al., 2019). *CPN20* نیز به عنوان یک چپرون علاوه بر نقش در بیوژنز روبیسکو، در سیگنال‌دهی ABA مشارکت دارد. *CPN20* در سطح پایین ABA به شدت با *ABAR* تعامل دارد. تعامل *CPN20* با *ABAR* در سطح ABA پایین، تعامل بین *ABAR* و *WRKY40* را کاهش می‌دهد. که به حفظ سطح مناسبی از *WRKY40* کمک می‌کند و آن ژن‌های پاسخ‌دهنده به ABA را سرکوب می‌کند. سطح بالای ABA برهمکنش *ABAR-CPN20* را مهار می‌کند، که به نوبه خود برهمکنش *ABAR-WRKY40* را تقویت می‌کند که باعث ایجاد سیگنال‌های پایین‌دستی برای سرکوب بیان *WRKY40* می‌شود و در نتیجه سرکوب ژن‌های پاسخ‌دهنده به ABA را از بین می‌برد (شکل ۶) (Zhang et al., 2014; Wilson et al., 2018). *AtGRDPI*<sup>۱۵</sup> یک پروتئین جدید است که حاوی یک دومین کوتاه غنی از گلیسین (Short glycine-rich domain)، یک دامنه *DUF1399* و یک موتیف احتمالی *RNP* است. تجزیه و تحلیل بیان نشان داد که ژن *AtGRDPI* در پاسخ به NaCl، LiCl، مانیتول، سوربیتول، گلوکز و ABA اگزوزن تعدیل می‌شود. برای بررسی نقش آن، لاین‌های جهش‌یافته و دارای بیان بیش‌ازحد ایجاد شد. لاین‌های جهش‌یافته *Atgrdp1-null* حساسیت بیشتری به شوری و تنش اسمزی در جوانه‌زنی و رشد لپه نشان دادند، در حالی که لاین‌های *35S::AtGRDPI* تحمل بیشتری به تنش غیرزیستی داشتند. بررسی ژن‌های *ABI3* و *ABI5* که تنظیم‌کننده‌های مرکزی در سیگنال‌دهی ABA هستند نشان داد که در شرایط ABA، جهش‌یافته‌ها سطح رونوشت بالاتری از این ژن‌ها داشته و در لاین‌های بیش‌بیان، این رونوشت‌ها سرکوب شدند. این نتایج نشان می‌دهد *AtGRDPI* نقش تنظیمی مهمی در سیگنال‌دهی ABA و تحمل به تنش‌های غیرزیستی دارد (شکل ۶) (Rodríguez-Hernández et al., 2014). براسینواستروئیدها (BRs) هورمون‌های گیاهی تنظیم‌کننده رشد و نمو هستند. مسیر بیوسنتز براسینولید (BL) از کمپسترول (CR) آغاز می‌شود و در مسیر سنتز هورمون براسینواستروئید (BR)، ژن (*ROTUNDIFOLIA 3 / CYP90C1*) 3-Epi-6-deoxocathasterone 23-monooxygenase *CYP90D1* کدکننده‌های سیتوکروم P450 3-epi-6-مونواکسیژنازها هستند که هر دو در مرحله کلیدی C-23 hydroxylation عمل می‌کنند. این آنزیم‌ها مولکول 3-

<sup>15</sup> Glycine-rich domain-containing protein 1

deoxocathasterone و دیگر واسطه‌های 6-deoxo را در موقعیت C-23 هیدروکسیله کرده و آن‌ها را به مشتقات 23-Hydroxylated تبدیل می‌کند.



شکل ۶. مسیر MEP برای تولید ایزوپرنوئیدها و سیگنالینگ ABA تحت تنش شوری، نقش *COPI*، *GRDP1* و *CPN20*

**Figure 6. MEP pathway for isoprenoid production and ABA signaling under salt stress, role of *COPI*, *CPN20* and *GRDP1***

این واکنش به‌عنوان یک میانبر (Shortcut) در مسیر اکسیداسیون C-6 عمل کرده و روند تبدیل ترکیبات واسطه 6-Deoxocastasterone به استروئیدهای فعال‌تر نظیر کستاسترون (CS) و در نهایت براسینولید (BL) را تسریع می‌کند و تضمین می‌کند که مسیر اصلی سنتز BR در گیاهان عمدتاً از طریق شاخه 6-Deoxo پیش برود (شکل ۷) (Wei et al., 2020).

BRs در غشای پلاسمایی (PM) توسط دومین خارج سلولی گیرنده  $BR11^{16}$ ، یک  $(LRR-RLK^{17})$  و گیرنده کمکی آن  $BAK1^{18}$  که یک  $LRR-RLK$  همه کاره درگیر در بسیاری از فرآیندهای علامت‌دهی است، درک می‌شوند (Li et al., 1997; Wang et al., 2001). تصور می‌شود که اتصال BR به پکت اتصال BR که توسط دومین‌های خارج سلولی  $BR11$  و  $BAK1$  تشکیل شده است باعث تغییرات ساختاری دومین‌های سیتوپلاسمی آن‌ها می‌شود (Nam et al., 2002; Sun et al., 2013).  $BR11$  متعاقباً مهارکننده خود  $BK11^{19}$  را فسفریله می‌کند و باعث جدا شدن آن از Plasma membrane می‌شود (Li et al., 2008). بدین ترتیب امکان هتروداپایمیزاسیون، فسفوریلاسیون متقابل، و فعال‌سازی کامل فعالیت کینازی  $BR11$  و  $BAK1$  فراهم می‌شود (Wang et al., 2005; Li et al., 2006; Wang et al., 2006; Nam et al., 2002; Wang et al., 2006).  $BR11$  کاملاً فعال شده یک سری رویدادهای فسفوریلاسیون یا دفسفوریلاسیون را برای انتقال سیگنال‌های BR خارج سلولی به داخل سیتوزول ایجاد می‌کند و  $CDG1^{20}$ ،  $BK1$  و برخی از همولوگ‌های آن‌ها را فسفریله می‌کند که منجر به فسفوریلاسیون و متعاقب آن فعال شدن اعضای یک خانواده منحصر به فرد پروتئین فسفاتازها ( $PPKs$ ) با دومین Kelch-like domain که شامل  $BSU1$  و  $BSL1-3$  ( $BSL1-3$ ) است، می‌شود (Tang et al., 2008; Lin et al., 2013; Kim et al., 2011). فسفریله شده باعث غیرفعال سازی  $BIN2^{21}$  می‌شود که عضوی از خانواده گیاهی کینازهای مشابه  $GSK3^{22}$  است، و دارای دفسفوریلاسیون یک باقیمانده تیروزین فسفریله شده (Tyr) در حلقه فعال سازی  $BIN2$  است، می‌شود (Kim et al., 2009).  $BIN2$  دفسفریله شده همچنین با  $KIB1^{23}$  که یک F-box E3 ubiquitin ligase است و منجر به یوبی کوئیتیناسیون  $BIN2$  و تخریب با واسطه پروتئازوم می‌شود، تعامل دارد. پس از غیرفعال شدن و تخریب  $BIN2$ ، دو عامل بسیار مشابه  $BIN2$  یعنی  $BZR1^{24}$  و  $BES1^{25}$  به سرعت توسط اعضای خاصی از خانواده  $PP2A^{26}$  دفسفریله می‌شود که منجر به تجمع هسته‌ای آن‌ها می‌شود (Tang et al., 2011).  $BZR1$  و  $BES1$  دفسفریله شده به محرک‌های هدف خود که در پروموتور خود حاوی BRRE (CGTGC/TG) (BR-response element) و/یا E-box (CANNTG) هستند متصل می‌شوند تا بیان هزاران ژن پاسخگو به BR را تنظیم کنند که برای رشد گیاه بسیار مهم هستند (شکل ۷) (He et al., 2005; Yin et al., 2005). اتیلن از متیونین و از طریق چرخه اس-آدنوزیل-ال-متیونین ( $S-AdoMet$ ) آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلیک اسید ( $ACC^{27}$ ) می‌شود. حدود ۸۰٪ متیونین سلولی توسط آنزیم  $S-AdoMet$  سنتتاز ( $SAMS^{30}$ ) به  $S-AdoMet$  تبدیل می‌گردد که یکی از اصلی‌ترین دهنده‌های متیل در مسیرهای بیوشیمیایی سلول است. در

<sup>16</sup> Brassinosteroid-Insensitive1

<sup>17</sup> Rich repeat receptor-like kinase (LRR-RLK) leucine

<sup>18</sup> BRI1-Associated receptor Kinase1

<sup>19</sup> BRI1 Kinase Inhibitor1

<sup>20</sup> Constitutive Differential Growth1

<sup>21</sup> BR-Signaling Kinase1

<sup>22</sup> Bri1 suppressor1

<sup>23</sup> Brassinosteroid-Insensitive2

<sup>24</sup> Glycogen Synthase Kinase3

<sup>25</sup> Kink suppressed in bzi1-ID1

<sup>26</sup> Brassinazole-resistant1

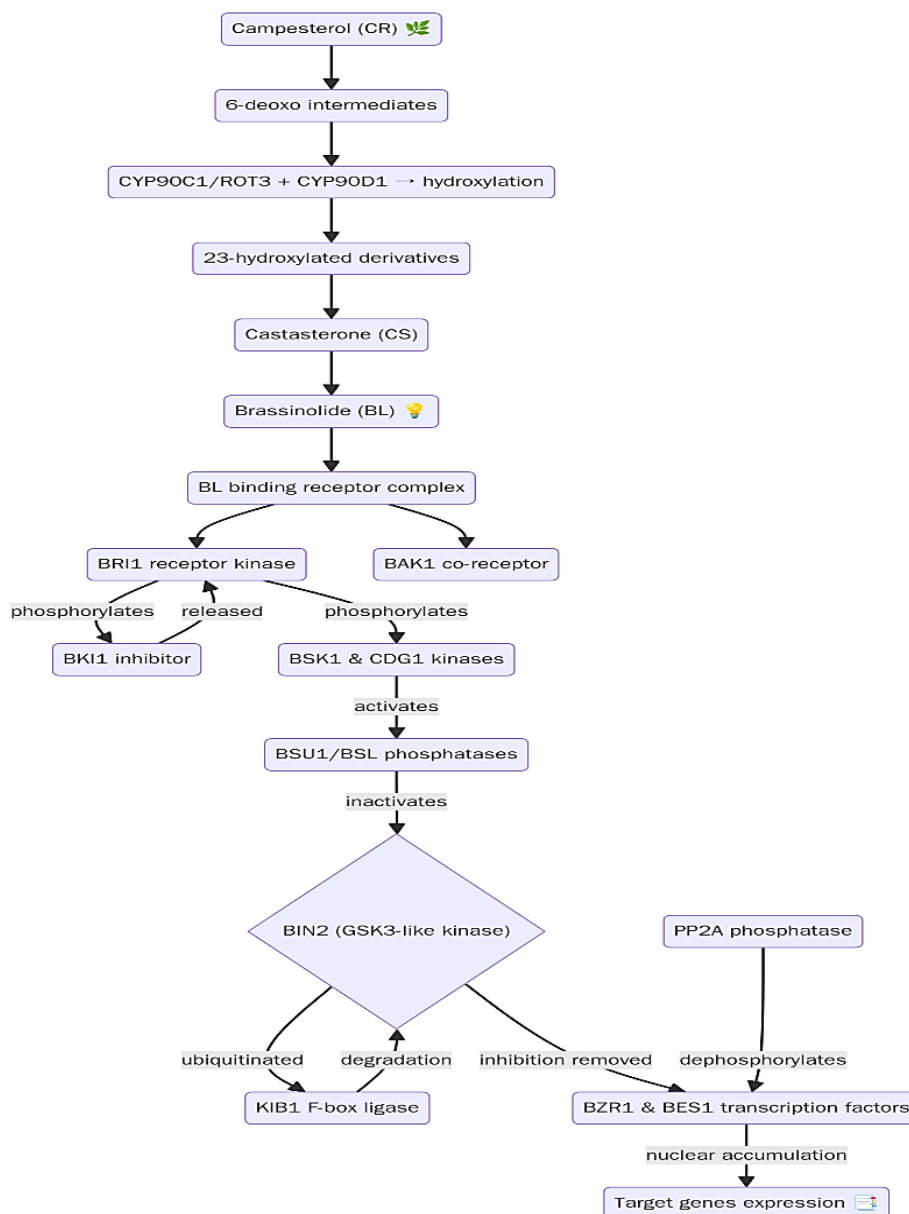
<sup>27</sup> Bri1-EMS suppressor1

<sup>28</sup> Protein phosphatase 2A

<sup>29</sup> 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid

<sup>30</sup> S-adenosyl-L-methionine synthetase

شرایط تنش شوری، آبشار SIT1-MPK3/6 phosphorylation cascade فعال شده و بیان ژن‌های کاتالیزوری ACC سنتاز ( $ACS^31$ ) و ACC اکسیداز ( $ACO^32$ ) افزایش می‌یابد.



شکل ۷. بیوسنتز و سیگنالینگ براسینواستروئیدها (BRs)

Figure 7. Biosynthesis and signaling of brassinosteroids (BRs)

فسفوریلایسیون  $ACSs$  توسط آبشار  $MPK3/6$  موجب فعال شدن آنزیم و سنتز  $ACC$  از  $S-AdoMet$  می‌شود. سپس  $ACC$  به وسیله  $ACC$  اکسیداز اکسید شده و اتیلن تولید می‌گردد (شکل ۸) (Yang et al., 1984). پس از سنتز، مولکول گازی اتیلن توسط گیرنده‌های پروتئینی غشای شبکه آندوپلاسمی شناسایی می‌شود. این پاسخ توسط خانواده پنج‌عضوی شامل  $ETR1$ ،

<sup>31</sup> ACC synthase

<sup>32</sup> ACC oxidase

<sup>33</sup> Ethylene Response1 Receptor 1

*ETR2*<sup>۳۴</sup>، *ERS1*<sup>۳۵</sup>، *ERS2*<sup>۳۶</sup> و *EIN4*<sup>۳۷</sup> و همچنین *CTR1*<sup>۳۸</sup> هدایت می‌گردد. این گیرنده‌ها مشابه گیرنده‌های هیستیدین کینازی دوجزئی در پروکاریوت‌ها هستند و به دو زیرخانواده یک: *ETR1* و *ERS1*، دو: *ETR2*، *ERS2*، *EIN4* تقسیم می‌شوند. مطالعات ژنتیکی و بیوشیمیایی نشان داده‌اند که گیرنده‌های اتیلن به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های منفی پاسخ به اتیلن عمل می‌کنند و اتصال اتیلن باعث غیرفعال شدن آن‌ها می‌شود. در ادامه، مسیر کلاسیک *CTR1-EIN2-EIN3* در پاسخ به تنش شوری فعال شده و فرآیندهایی چون هموستازی ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  برای تنظیم فشار اسمزی)، تنظیم مواد غذایی (Nutrients) و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را کنترل می‌کند و در نتیجه مقاومت گیاه به تنش شوری افزایش می‌یابد (شکل ۸) (Rani et al., 2014; Schmitzer et al., 2010). به طور کلی، گیرنده‌های هورمونی و مسیرهای سیگنالینگ آنها نقش حیاتی در تنظیم پاسخ‌های گیاه به تنش‌های مختلف دارند. تنش شوری در گیاهان باعث افزایش سطح کلسیم سیتوزولی می‌شود که این افزایش به عنوان سیگنال راه‌انداز مسیرهای پاسخ به تنش عمل می‌کند، مانند بسته شدن روزنه‌ها برای جلوگیری از اتلاف آب (Shi, 2007). این افزایش کلسیم توسط کانال‌های کلسیمی در غشای پلاسمایی و آندوپلاسمی ایجاد می‌شود و با اتصال به پروتئین‌های حساس به کلسیم مثل کالمودولین، فعالیت آنزیم‌های وابسته به کلسیم مانند پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم/کالمودولین را افزایش می‌دهد که با فسفریله کردن پروتئین‌های هدف، مسیرهای انتقال پیام درون سلولی را فعال و منجر به بسته شدن روزنه‌ها می‌شود (Hadi et al., 2012). اتصال ABA به *PYR/PYL/RCAR* فعالیت *PP2C* را مهار کرده و باعث فسفریلاسیون *OST1* می‌شود. *OST1* فعال شده، NADPH اکسیداز را برای تولید ROS و کانال‌های یونی *QUACI* (کانال آبیون سریع ۱) و *SLACI* (کانال یون آهسته ۱) را برای خروج یون‌ها فعال می‌کند. پیام‌رسان‌های ثانویه مانند ROS، NO، و  $\text{Ca}^{2+}$  سیتوزولی، با افزایش pH و فعال‌سازی کینازها مانند MPK3/6 و *CDPKs* نقش مهمی در این فرآیند ایفا می‌کنند. NO نیز به نوبه خود، کانال‌های  $\text{K}^+$  را تنظیم کرده و سطوح  $\text{Ca}^{2+}$  سیتوزولی را از طریق *cGMP* (گوانوزین مونوفسفات حلقوی) و *cADPR* (ریبوز ADP حلقوی) افزایش می‌دهد. افزایش  $\text{Ca}^{2+}$  سیتوزولی می‌تواند پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم (*CDPKs*) را فعال کند که این کینازها، کانال‌های *SLACI* و S-type anion channel 3 را تحریک کرده و همزمان کانال‌های ورودی  $\text{K}^+$  را مهار می‌کنند. این اثرات متقابل پیام‌رسان‌ها منجر به خروج یون و از دست دادن تورگور در سلول‌های نگهبان روزنه می‌شود. همچنین، NO می‌تواند فعالیت آنزیم‌های *PLC* و *PLD* (فسفولیپاز C و D) را برای تولید *IP3* (اینوزیتول ۱،۴،۵-تری فسفات) و افزایش  $\text{Ca}^{2+}$  سیتوزولی تحریک کند. در نهایت، سیگنال‌دهی ABA از طریق این مسیرهای مولکولی پیچیده و با فعال‌سازی و مهار کانال‌های یونی، باعث خروج یون‌ها از سلول و در نتیجه بسته شدن روزنه‌ها می‌گردد (Boschiero et al., 2019). کالمادولین *CAM7*، پروتئین کوچکی با ساختار چهار EF-hand، در حضور کلسیم فعال می‌شود و با اتصال به *SOS3*، پمپ  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  به نام *SOS1* را از طریق پروتئین کیناز *SOS2* فعال می‌کند که باعث خروج سدیم از سلول و افزایش تحمل به شوری می‌شود (Guo et al., 2004). کالمادولین همچنین با تنظیم فاکتورهای رونویسی و فعالیت‌های آنزیمی به حفظ تعادل یونی در شرایط تنش کمک می‌کند. ژن *CAS* (Calcium Sensing Receptor) در تنظیم سطح کلسیم سیتوزولی و بسته شدن روزنه‌ها نقش دارد. افزایش کلسیم خارج سلولی باعث کاهش اتصال پروتئین *CAUI* به *CAS* و در نتیجه افزایش بیان ژن *CAS* می‌شود. این افزایش باعث بالا رفتن سطح کلسیم سیتوزولی و بسته شدن روزنه‌ها می‌گردد که

<sup>34</sup> Ethylene Response1 Receptor 2

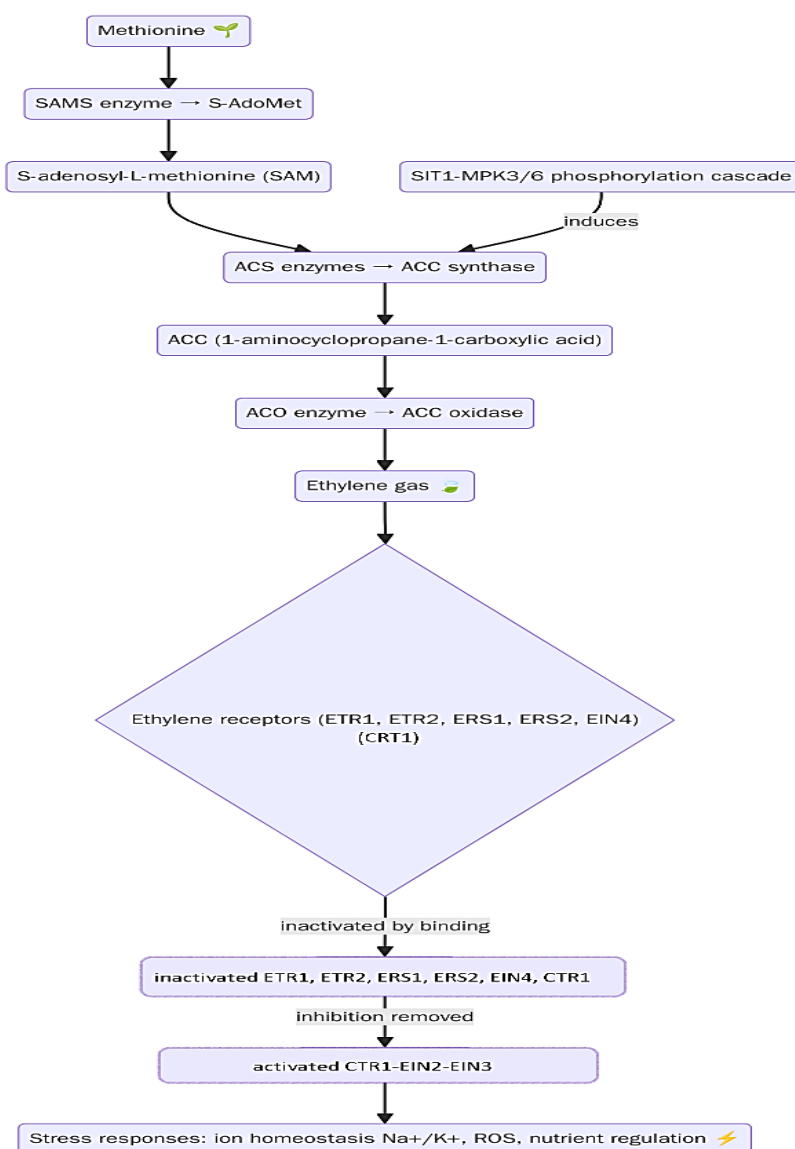
<sup>35</sup> Thylene Response Sensor 1

<sup>36</sup> Ethylene Response Sensor 2

<sup>37</sup> Ethylene Insensitive 4

<sup>38</sup> Constitutive Triple Response1

سرعت تعرق را کاهش داده و انتقال کلسیم به اندام‌های هوایی را تنظیم می‌کند، ایجاد هماهنگی پویا بین کلسیم خارج سلولی و بسته شدن روزنه‌ها برای سازگاری گیاه با محیط مورد نیاز است (شکل ۹) (Fu et al., 2013).

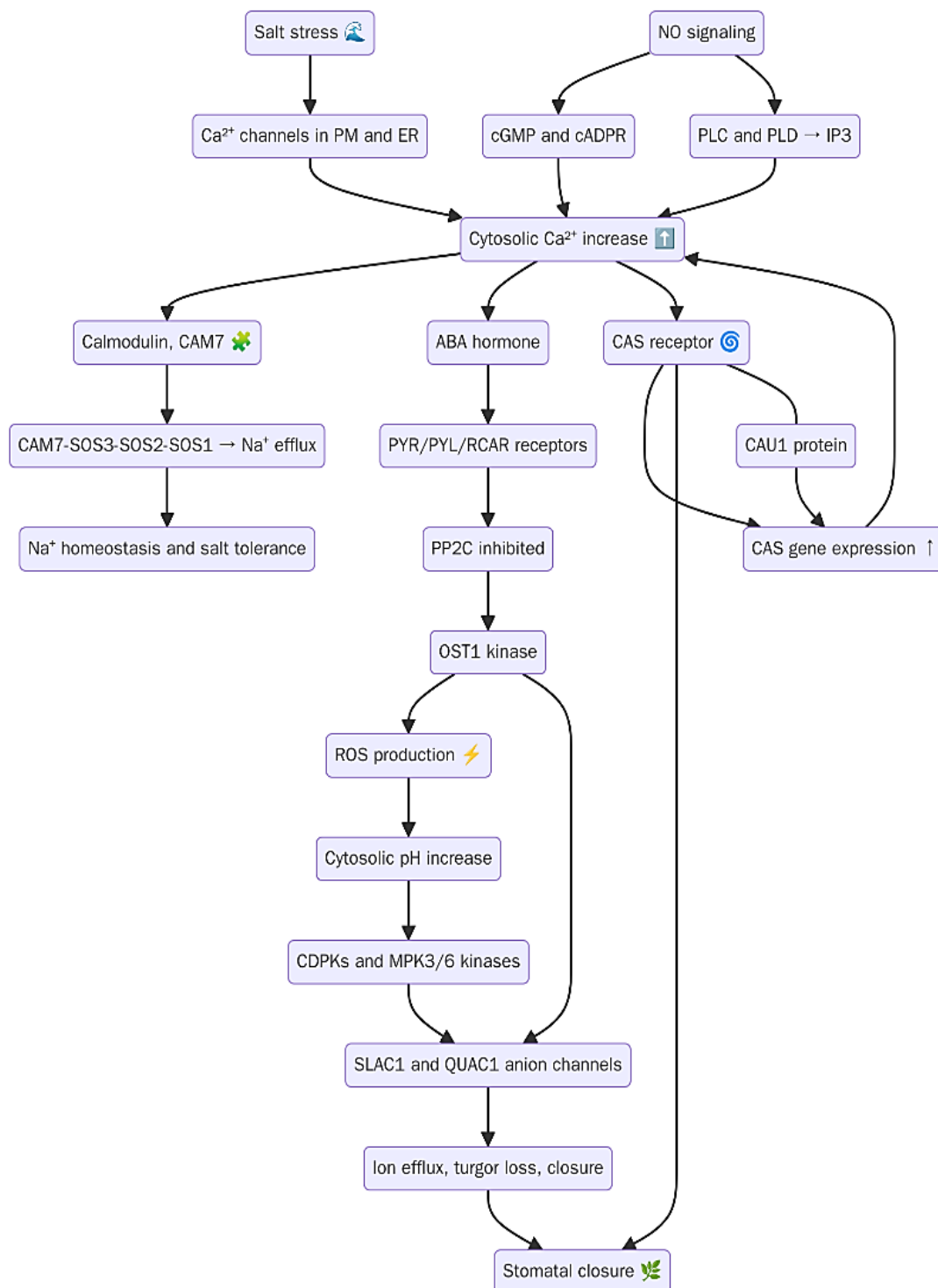


شکل ۸. بیوسنتز و سیگنالینگ اتیلن در تنش شوری

Figure 8. Biosynthesis and ethylene signaling under salt stress

فرآیندهای منجر به افزایش تحمل گیاهان به تنش شوری در چندین سطح سلولی شامل تنظیم همانندسازی DNA، دسترسی به ژن‌ها، فاکتورهای رونویسی و پردازش پس از رونویسی RNA رخ می‌دهند. پروتئین‌های *MCM* کمپلکس هگزامری *MCM2-7* را تشکیل داده و در همانندسازی DNA نقش دارند (Dang et al., 2011). و ژن‌های کدکننده *MCM*ها تحت تأثیر تنش‌های غیرزیستی مانند شوری تنظیم می‌شوند (Kim et al., 2008). بیش بیان زیرواحد *MCM6* در نخود، تحمل گیاهان تراریخته به شوری را افزایش می‌دهد (Dang et al., 2011). DNA در اطراف نوکلئوزوم‌ها پیچیده و به هیستون‌ها

متصل می‌شود، که بر دسترسی ماشین رونویسی و بیان ژن تأثیرگذار است. در شرایط تنش، واریانت *HI.3* جایگزین *HI* شده و هایپرمتیلاسیون DNA رخ می‌دهد که بر بیان ژن‌های پاسخ به تنش تأثیر می‌گذارد (Asensi-Fabado et al., 2017).

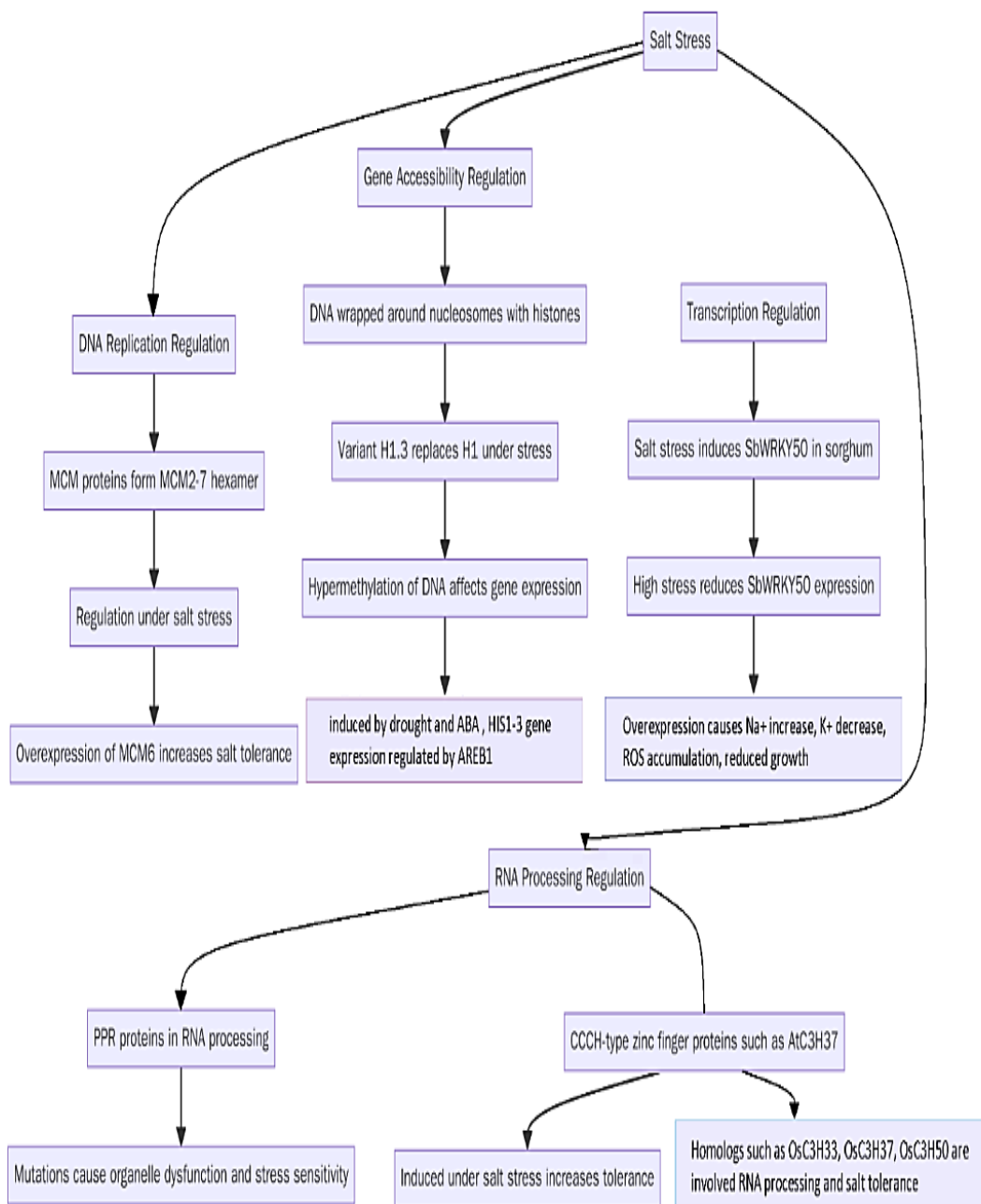


شکل ۹. سیگنالینگ کلسیم در پاسخ به تنش شوری و بسته شدن روزنه‌ها، نقش *CAS* و *CAM7*

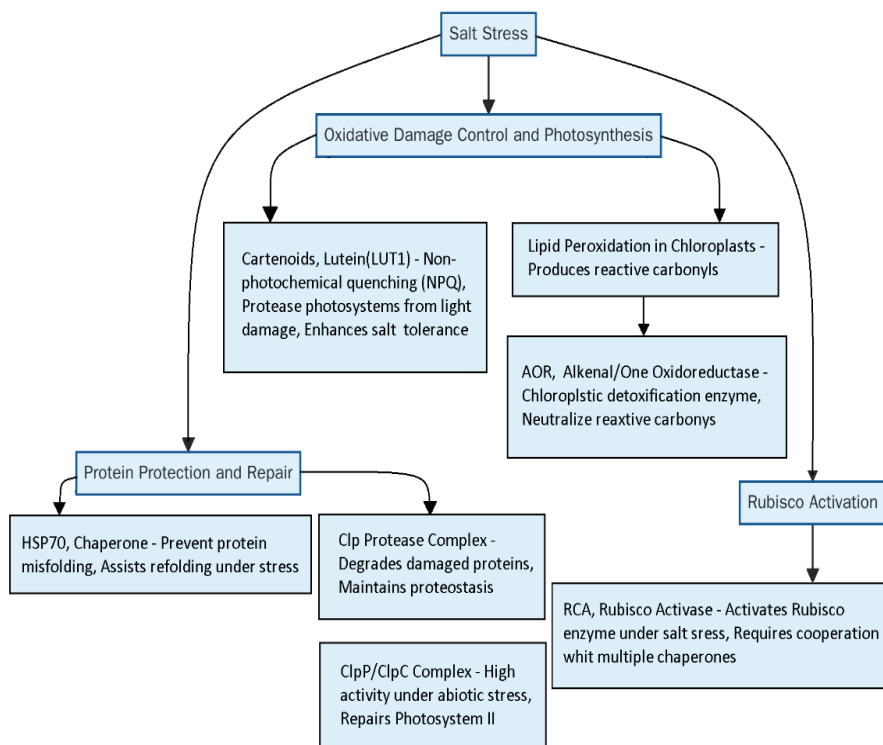
Figure 9. Calcium signaling in response to salt stress and stomatal closure, role of *CAM7* and *CAS*

در آرآیدوپسیس، بیان ژن *HIS1-3* کدکننده *HI.3* توسط خشکی و ABA القا و توسط *AREBI* تنظیم می‌شود (Ascenzi & Gantt 1997). فاکتورهای رونویسی *WRKY* مانند *SbWRKY50* در سورگوم تحت تنش شوری القا و با افزایش شدت تنش، بیان آن کاهش می‌یابد و بیش بیان *SbWRKY50* در آرآیدوپسیس منجر به افزایش سدیم، کاهش پتاسیم، تجمع ROS و کاهش رشد می‌شود (Szekely et al., 2008; Song et al., 2020). پروتئین‌های *PPR* در پردازش RNA و پاسخ به تنش‌های محیطی نقش دارند، و جهش در ژن‌های *PPR* منجر به اختلال در کارکرد اندامک‌ها و حساسیت به تنش می‌شود (Xing et al., 2000; Small et al., 2018). پروتئین‌های Zinc finger CCCH مانند *AtC3H37* توسط تنش شوری القا شده و در تحمل گیاه به این تنش نقش دارند (Han et al., 2021). ژن‌هایی مانند *OsC3H33*، *OsC3H37* و *OsC3H50* در برنج مسئول کارکردهای تنظیمی از جمله پردازش RNA و تحمل به شوری هستند که بیان آنها تحت تنش شوری القا می‌شود تحت تنش شوری القا می‌شوند (شکل ۱۰) (Jin et al., 2010). گیاهان برای حفظ یا بازسازی ساختار پروتئین‌های آسیب‌دیده از مولکول‌هایی مانند پروتئازها و چاپرون‌ها استفاده می‌کنند. به‌عنوان نمونه، پروتئین‌های محافظ مانند *Hsp70* و *Clp* پروتئاز در گیاهان تحت تنش‌هایی نظیر شوری واکنش فعالیت می‌کنند و در حفظ ساختار و تعمیر پروتئین‌ها نقش دارند این پروتئین‌ها همچنین در ترمیم فتوسیستم II در مقابل تنش‌های غیرزیستی مؤثر هستند (Schroda et al., 2001). در مقابل، تنش‌های آسیب‌رسان می‌توانند پروتئازهای مانند کمپلکس *ClpP/ClpC* در پروکاریوت‌ها و پلاستیدهای گیاهان را فعال‌تر کرده و در تخریب پروتئین‌های آسیب‌دیده نقش داشته باشند (Olinares et al., 2011b). علاوه بر این، گیاهان برای مقابله با آسیب اکسیداتیو و حفظ فعالیت فتوسنتزی با استفاده از کاروتنوئیدها، به ویژه لوتئین، که در حفاظت از فتوسنتز و خاموش کردن غیرفتوشیمیایی (NPQ) نقش دارد، به تنظیم فتوسیستم و مقابله با آسیب‌های نوری پرداخته و تحمل به شوری را افزایش می‌دهند (Huang et al., 2010). همچنین کربونیل‌های واکنش‌پذیر حاصل از پراکسیداسیون اسیدهای چرب در کلروپلاست‌ها به وسیله NADPH ردوکتازهای کلروپلاستی مانند *Alkenal/One oxidoreductase (AOR)* سم‌زدایی می‌شوند (Yamauchi et al., 2011). همچنین گیاهان برای عملکرد بهینه فتوسنتز در شرایط تنش، اقدام به فعال‌سازی رویسکو توسط رویسکو اکتیواز (*Rca*) می‌کند و فرآیند بیوژنز آن با هماهنگی چاپرون‌های متعدد صورت می‌گیرد (شکل ۱۱) (Bhat et al., 2017). تجزیه پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی نیز به تنظیم فشار اسمزی کمک می‌کند و که این فرایندها با بتا-گالاکتوزیدازها و ژن‌های *bgal* که در تخریب دیواره سلولی و متابولیسم سیگنال دخیل هستند، همراه است (Pandey et al., 2017). همچنین، تولید موم کوتیکولی تحت نظارت ژن *LACSI*، با کاهش ترقق، مقاومت گیاهان به خشکی، شوری، دمای بالا و نور زیاد را افزایش می‌دهد، که این فرایند به تبدیل اسیدهای چرب به *Acyl-CoA* و تغذیه از طریق شبکه آندوپلاسمی (ER) بستگی دارد (Post-Beittenmiller et al., 1996). در پاسخ به شرایط نامطلوب، کینازهای وابسته به سیکلین (*CDK*) با همراهی سیکلین‌ها، کنترل چرخه سلولی را تنظیم و با فعالیت مهارکننده‌هایی همچون *SIM*، *WEE* و *KRP*، به توقف چرخه سلولی در پاسخ به آسیب DNA منجر می‌شوند، که این سیگنال‌دهی توسط *ATM/ATR* به تولید پروتئین‌های *ANAC044/085* و *CKI* و تنظیم چرخه در G2 کمک می‌کند (شکل ۱۲) (Carneiro et al., 2021). با توجه به بررسی عملکردی ژن‌های هاب که بیان شد، می‌توان دریافت که شبکه‌ای پیچیده از مسیرهای هورمونی، پیام‌رسانی یونی و تنظیمات مولکولی به‌طور هماهنگ در ایجاد مقاومت به تنش شوری نقش‌آفرینی می‌کنند. شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که هم از طریق ایجاد سمیت یونی ناشی از تجمع  $Na^+$  و  $Cl^-$  و هم از طریق ایجاد تنش اسمزی و کاهش پتانسیل آب، رشد و توسعه گیاه را محدود می‌سازد. گیاهان برای سازگاری با این شرایط، مجموعه‌ای از مکانیسم‌های دفاعی در سطوح مختلف

سلولی، مولکولی و فیزیولوژیک فعال می‌کنند. نتایج این پژوهش روشن ساخت که ژن‌های هاب شناسایی شده در شبکه‌های GRN و PPI نقشی کلیدی در هماهنگی این مکانیسم‌ها ایفا می‌کنند. در سطح هورمونی، مسیرهای ABA، براسینواستروئید و اتیلن به‌عنوان سه محور اصلی در القای تحمل شوری شناسایی شدند. ABA با تنظیم بیان ژن‌ها و کنترل باز و بسته شدن روزنه‌ها، نقش مهمی در کاهش تعرق و جلوگیری از اتلاف آب ایفا می‌کند. براسینواستروئیدها عمدتاً از طریق تحریک مسیرهای رشد و تقویت سیگنال‌دهی دفاعی، به بازسازی تعادل یونی و کاهش آسیب اکسیداتیو کمک می‌کنند.

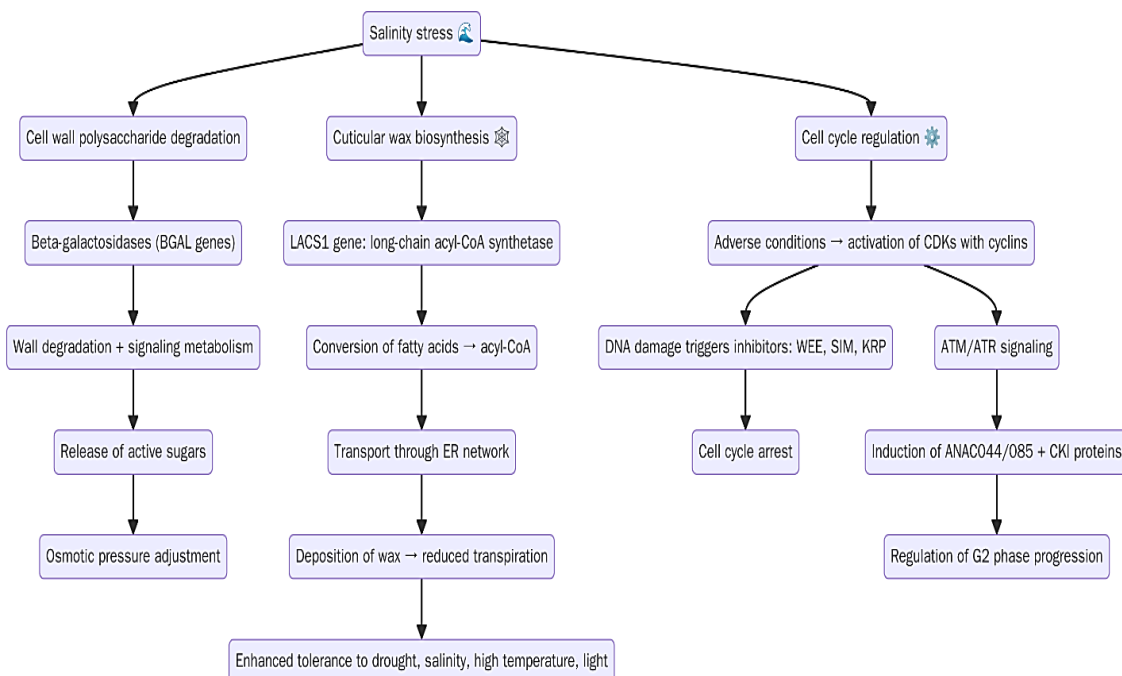


شکل ۱۰. تنظیم همانندسازی DNA، دسترسی به ژن‌ها، رونویسی و پردازش RNA تحت تنش شوری  
 Figure 10. Regulation of DNA replication, gene accessibility, transcription, and RNA processing under salt stress



شکل ۱۱. حفظ ساختار پروتئین‌ها، حفاظت کلروپلاست و فعالیت فتوسنتز تحت تنش شوری

Figure 11. Preservation of protein structure, chloroplast protection, and photosynthetic activity under salt stress



شکل ۱۲. تنظیم فشار اسمزی، تولید موم کوتیکولی و کنترل چرخه سلولی در تنش شوری

Figure 12. Regulation of osmotic pressure, cuticular wax production, and cell cycle control under salt stress

از سوی دیگر، اتیلن به عنوان یک هورمون دخیل در واکنش به تنش، مسیرهای بیولوژیک که در تنظیم یون‌ها، سنتز ROS، سیگنالینگ دفاعی، و سیستم خطای دفاعی نقش دارند را فعال میکند تا گیاه از وضعیت استرسی عبور کند. حضور ژن‌های هاب *BAK1*، *PP2CA*، *CYP90C1* و *ETRI* در این مسیرها نشان دهنده این است که تنظیم دقیق این هورمون‌ها برای بقا و رشد در محیط با شوری بالا ضروری می‌باشد. نقش کلسیم به عنوان پیام‌رسان ثانویه نیز برجسته بود. افزایش گذرای  $Ca^{2+}$  سیتوزولی به عنوان یک سیگنال سریع، با فعال‌سازی کالمودولین و پروتئین‌های وابسته به کلسیم (مانند *CDPK*‌ها)، مسیر SOS را تحریک کرده و از این طریق دفع  $Na^{+}$  و بازگرداندن تعادل یونی را ممکن می‌سازد. این پیام‌رسانی به‌طور هم‌زمان با مسیرهای ABA و ROS عمل کرده و باعث بسته‌شدن روزنه‌ها و حفظ وضعیت اسمزی سلول می‌شود. از سوی دیگر، مجموعه‌ای از ژن‌های هاب در تنظیم ژنی و پردازش RNA فعالیت داشتند. کمپلکس مولکولی *MCM2-7* در همانندسازی DNA، پروتئین‌های خانواده *WRKY* در تنظیم بیان ژن‌های دفاعی، و پروتئین‌های *PPR* و *CCCH* در پردازش RNA و پایدارسازی رونویسی تحت شوری نقش دارند. این موضوع نشان می‌دهد که تحمل به شوری تنها ناشی از مسیرهای فیزیولوژیک نیست، بلکه نیازمند بازآرایی وسیع در سطح شبکه‌های تنظیمی ژن‌ها نیز می‌باشد. دسته ژنی دیگری مانند *HSP70*، *ClpP* و *RCA* بطور عمده در حفظ پایداری پروتئین‌ها و کلروپلاست دخایل بودند. این ژن‌ها با جلوگیری از دناتوره شدن پروتئین‌ها و فعال‌سازی مجدد آنزیم‌های فتوسنتزی، نقش مستقیمی در تداوم فتوسنتز و کاهش در آسیب اکسیداتیو دارند. بطور هم‌زمان ژن‌های *LUTI* و *AOR* در حفاظت فتوسیستم‌ها از طریق سنتز رنگیزه‌ها و تنظیم ترکیبات آنتی‌اکسیدانی حائز اهمیت هستند. نهایتاً، ژن‌هایی مانند *BGAL* و *LACSI* در سطح ساختار سلولی و فیزیولوژی بافتی نقش ایفا میکنند و با افزایش سطح سنتز موم کوتیکولی و تغییر در ساختار دیواره سلولی، باعث کاهش در نفوذپذیری نمک به درون سلول‌ها و حفظ فشار اسمزی میگردند. اینچنین تغییرات مورفولوژیک، همراه با بسته شدن روزنه‌ها، کمک میکند که گیاه از اتلاف آب جلوگیری کرده و بقی خود را در شرایط شور را افزایش دهد. به طور کلی، نتایج این مطالعه حاکی از آن است که مقاومت به شوری محصول تعامل پیچیده میان مسیرهای هورمونی، سیگنالینگ یونی، تنظیم ژنی، حفاظت پروتئینی و تغییرات ساختاری می‌باشد. مطالعه و شناسایی ژن‌های هاب درگیر در این مسیرها چشم‌انداز جدیدی برای اصلاح گیاهان مقاوم به شوری فراهم میکند. این ژن‌ها نه تنها به عنوان نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های به‌نژادی استفاده میشوند، بلکه این پتانسیل را دارند که اهداف بالقوه‌ای برای دستکاری ژنتیکی و تولید ارقام متحمل به شوری باشند. درک جامع این شبکه‌ها گامی اساسی در جهت افزایش پایداری تولیدات کشاورزی در شرایط اقلیمی آینده محسوب می‌شود.

**نتیجه‌گیری:** در پژوهش حاضر، تلاش برای شناسایی و تحلیل ژن‌های مسئول در پاسخ گیاه آفتابگردان به شوری از طریق بازسازی شبکه‌های تنظیم ژنی و برهم‌کنش پروتئینی صورت گرفت که منجر به شناسایی ۲۹ ژن کلیدی شد. به نظر می‌رسد این ژن‌ها در تحمل به شوری نقش اساسی ایفا می‌کنند. نتایج هستی‌شناسی ژنی نشان داد که آفتابگردان از طریق یک شبکه پیچیده از مسیرهای مولکولی متنوع توانایی مقاومت در برابر شوری را پیدا می‌کند. این شبکه شامل تنظیم بیوسنتز و پیام‌رسانی هورمون‌های گیاهی مانند ABA، اتیلن، اکسین و براسینواستروئید است که نقش مهمی در پاسخ به تنش ایفا می‌کنند. همچنین، پروتئین‌های

حساس به تنش مانند پروتئین‌های متصل‌شونده به کلسیم و پروتئین‌های دارای دومین‌های حسگر یونی، در شناسایی شوری و بهبود پاسخ‌های سلولی مؤثر بودند. در سطح ژنومی و رونویسی، آفتابگردان با تنظیم فاکتورهای رونویسی مرتبط با تنش، تغییر در دسترسی به ژن‌ها و پردازش پس از رونویسی RNA، بیان ژنی خود را بازآرایی می‌کند. علاوه بر این، افزایش بیان پروتئین‌های شوک گرمایی، چپرون‌ها و پروتئازها موجب حفظ ساختار و عملکرد پروتئین‌ها و غشاها در شرایط شور شد. نهایتاً، تنظیم ژن‌های کنترل‌کننده چرخه سلولی و تقسیم سلولی به گیاه امکان می‌دهد منابع انرژی را مدیریت کرده و رشد و بقا را در شرایط تنش حفظ کند. از دیدگاه کاربردی، شناسایی ژن‌های هاب معرفی شده در این پژوهش می‌تواند به عنوان اهداف کلیدی در برنامه‌های اصلاحی برای تولید ارقام مقاوم به شوری مورد استفاده قرار گیرد. این ژن‌ها قابلیت آن را دارند که در فعالیتهای به‌نژادی در انتخاب به کمک نشانگر (Marker-assisted selection) و یا اهدافی برای دستکاری ژنتیکی از طریق فناوری‌هایی مانند ویرایش ژنوم (CRISPR-Cas) به کار گرفته شوند. بهره‌گیری از این نتایج می‌تواند در توسعه ارقام آفتابگردان مقاوم به شوری، افزایش پایداری عملکرد در خاک‌های شور و در نهایت ارتقای امنیت غذایی نقش تعیین‌کننده‌ای داشته باشد. در ادامه بررسی موارد زیر پیشنهاد می‌شوند: ۱- اعتبارسنجی عملکرد ژن‌های هاب شناسایی شده در شرایط واقعی مزرعه؛ اگرچه نتایج حاضر بر اساس تحلیل‌های بیوانفورماتیکی و شبکه‌های برهم‌کنش به دست آمد، اما برای تأیید نقش واقعی ژن‌های کلیدی، لازم است بیان آن‌ها در شرایط کنترل شده و مزرعه‌ای به صورت تجربی بررسی شود. به ویژه، استفاده از qRT-PCR و RNA-seq زمان‌مند (Time-course) (RNA-seq) قادر است الگوهای دینامیک بیان این ژن‌ها را در مراحل مختلف رشد گیاه و در سطوح مختلف شوری مطالعه و شناسایی کند. این روش نه تنها امکان تأیید ژن‌های کاندیدا را فراهم می‌کند، بلکه نقاط تنظیمی حساس حساس (Regulatory nodes) را نیز مشخص می‌سازد. ۲- مطالعات عملکردی با استفاده از تکنولوژی ویرایش ژنوم؛ ژن‌های هاب شناسایی شده باید به‌ویژه آن‌هایی که در مسیرهای هورمونی مانند *PP2CA*، *BAK1* و *COP1* یا مسیرهای دفع یون مانند *SOS1* و *HKT1* قرار دارند، با کمک تکنیک‌های ویرایش ژنی مانند CRISPR/Cas9 به طور اختصاصی دستکاری شوند. ایجاد خطوط Knock-out و Overexpression این ژن‌ها در آفتابگردان یا گونه‌های مدل مانند *Arabidopsis* می‌تواند نقش مستقیم آن‌ها در تحمل به شوری را به وضوح نشان دهد. علاوه بر این، بررسی اثرات پلی مورفیسم‌های طبیعی در نواحی پرموتوری این ژن‌ها نیز می‌تواند درک دقیق‌تری از تنظیم آن‌ها ارائه دهد. ۳- یکپارچه‌سازی داده‌های چند اُمیک (Multi-omics integration)؛ از آنجا که شوری نه تنها مسیرهای ژنی بلکه متابولیت‌ها و پروتئین‌ها را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد، ترکیب داده‌های ترانسکریپتومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس ضروری است. چنین رویکردی می‌تواند مسیرهای بیوشیمیایی دخیل در سنتز متابولیت‌های محافظ (مانند پرولین، گلیسین بتائین و آنتی‌اکسیدان‌ها) را با بیان ژن‌های کلیدی مرتبط کند و به شناسایی نقاط اتصال میان ژن‌ها و متابولیت‌ها در شرایط شور کمک نماید. ۴- بررسی تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های مختلف آفتابگردان؛ برای بهره‌برداری عملی در برنامه‌های اصلاحی، مطالعه تنوع طبیعی ژن‌های هاب شناسایی شده در ژرم پلاسماهای بومی و تجاری آفتابگردان اهمیت ویژه‌ای دارد. استفاده از روش‌های GWAS (Genome-wide association study) و Genomic selection بر اساس این ژن‌ها، می‌تواند به شناسایی آلل‌های مطلوب و معرفی ژنوتیپ‌های مقاوم کمک کند. این داده‌ها همچنین قابلیت استفاده در برنامه‌های Marker-assisted selection برای تسریع روند اصلاح را دارند. ۵- مطالعات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مکمل؛ به منظور ارتباط دقیق میان ژن‌ها و فنوتیپ‌های مقاوم، لازم است آزمایش‌های فیزیولوژیکی مانند اندازه‌گیری میزان ROS و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (*SOD*, *CAT*, *POD*) محتوای پرولین و تغییرات اسمزی در ژنوتیپ‌های مختلف

انجام شود. تطبیق این داده‌ها با الگوهای بیان ژنی، تصویری جامع از سازوکارهای مولکولی و فیزیولوژیک مقاومت به شوری ارائه می‌دهد. ۶- تولید ارقام مقاوم: در نهایت، پیشنهاد می‌شود از ژن‌های هاب شناسایی شده به‌عنوان اهداف اصلاحی در تولید ارقام مقاوم استفاده گردد. این کار می‌تواند از طریق روش‌های تراریختی، انتخاب به‌کمک نشانگر (MAS) و یا ویرایش ژنی انجام شود. همچنین، ایجاد جمعیت‌های دو رگه و بررسی عملکرد ژن‌های کلیدی در زمینه‌های ژنتیکی متفاوت، امکان ارزیابی پایداری این ژن‌ها در شرایط متنوع محیطی را فراهم می‌آورد.

**سپاسگزاری:** از معاونین محترم پژوهشی دانشگاه تهران و دانشگاه ارومیه به دلیل همکاری و حمایت از انجام این پژوهش

صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

## References

- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq—A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, *31*(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Andrews, S. (2010). *FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data* [Computer software]. Babraham Bioinformatics. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Ascenzi, R., & Gantt, J. S. (1997). A drought-stress-inducible histone gene in *Arabidopsis thaliana* is a member of a distinct class of plant linker histone variants. *Plant Molecular Biology*, *34*(4), 629–641. <https://doi.org/10.1023/A:1005886012422>
- Asensi-Fabado, M. A., Amtmann, A., & Perrella, G. (2017). The chromatin context of transcriptional regulation in plant responses to abiotic stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, *1860*(1), 106–122. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.07.010>
- Barnhart, M. H., Masalia, R. R., Mosley, L. J., & Burke, J. M. (2022). Phenotypic and transcriptomic responses of cultivated sunflower seedlings (*Helianthus annuus* L.) to four abiotic stresses. *PLOS ONE*, *17*(9), Article e0275462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275462>
- Bhat, J. Y., Thieulin-Pardo, G., Hartl, F. U., & Hayer-Hartl, M. (2017). Rubisco activases: AAA+ chaperones adapted to enzyme repair. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *4*, Article 20. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00020>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Boschiero, C., Lundquist, P. K., Roy, S., Dai, X., Zhao, P. X., & Scheible, W.-R. (2019). Identification and functional investigation of genome-encoded, small, secreted peptides in plants. *Current Protocols in Plant Biology*, *4*(3), Article e20098. <https://doi.org/10.1002/cppb.20098>
- Carneiro, A. K., Montessoro, P. D. F., Fusaro, A. F., Araújo, B. G., & Hemerly, A. S. (2021). Plant CDKs—driving the cell cycle through climate change. *Plants*, *10*(9), Article 1804. <https://doi.org/10.3390/plants10091804>

- Chen, S.-H., Chin, C.-H., Wu, H.-H., Ho, C.-W., Ko, M.-T., & Lin, C.-Y. (2009). cytoHubba: A Cytoscape plug-in for hub object analysis in network biology. In *Proceedings of the 20th International Conference on Genome Informatics*.
- Cheng, M.-C., Liao, P.-M., Kuo, W.-W., & Lin, T.-P. (2013). The Arabidopsis ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting elements in response to different stress signals. *Plant Physiology*, *162*(3), 1566–1582. <https://doi.org/10.1104/pp.113.221507>
- Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., ... Li, H. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*, *10*(2), Article giab008. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
- Dang, H. Q., Tran, N. Q., Gill, S. S., Tuteja, R., & Tuteja, N. (2011). A single subunit MCM6 from pea promotes salinity stress tolerance without affecting yield. *Plant Molecular Biology*, *76*(1–2), 19–34. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9758-2>
- Dehmer, M., Mueller, L. A., & Emmert-Streib, F. (2013). Quantitative network measures as biomarkers for classifying prostate cancer disease states: A systems approach to diagnostic biomarkers. *PLOS ONE*, *8*(11), Article e77602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077602>
- Dreyer, I., & Uozumi, N. (2011). Potassium channels in plant cells. *FEBS Journal*, *278*(22), 4293–4303. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08371.x>
- Fernandez, P., Di Rienzo, J., Fernandez, L., Hopp, H. E., Paniego, N., & Heinz, R. A. (2008). Transcriptomic identification of candidate genes involved in sunflower responses to chilling and salt stresses based on cDNA microarray analysis. *BMC Plant Biology*, *8*, Article 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-11>
- Fu, Y.-L., Zhang, G.-B., Lv, X.-F., Guan, Y., Yi, H.-Y., & Gong, J.-M. (2013). Arabidopsis histone methylase CAU1/PRMT5/SKB1 acts as an epigenetic suppressor of the calcium signaling gene CAS to mediate stomatal closure in response to extracellular calcium. *The Plant Cell*, *25*(8), 2878–2891. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113886>
- Fujita, Y., Yoshida, T., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013). Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiologia Plantarum*, *147*(1), 15–27. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01635.x>
- Golldack, D., Lüking, I., & Yang, O. (2011). Plant tolerance to drought and salinity: Stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Reports*, *30*(8), 1383–1391. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1068-0>
- Guo, Y., Qiu, Q.-S., Quintero, F. J., Pardo, J. M., Ohta, M., Zhang, C., ... Zhu, J.-K. (2004). Transgenic evaluation of activated mutant alleles of SOS2 reveals a critical requirement for its kinase activity and C-terminal regulatory domain for salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, *16*(2), 435–449. <https://doi.org/10.1105/tpc.019174>
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., ... Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity

- platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8(8), 1494–1512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
- Hadi, M. R., & Karimi, N. (2012). The role of calcium in plants' salt tolerance. *Journal of Plant Nutrition*, 35(13), 2037–2054. <https://doi.org/10.1080/01904167.2012.717158>
- Han, G., Qiao, Z., Li, Y., Wang, C., & Wang, B. (2021). The roles of CCCH zinc-finger proteins in plant abiotic stress tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), Article 8327. <https://doi.org/10.3390/ijms22158327>
- Hasanuzzaman, M., Oku, H., Nahar, K., Bhuyan, M. B., Mahmud, J. A., Baluska, F., & Fujita, M. (2018). Nitric oxide-induced salt stress tolerance in plants: ROS metabolism, signaling, and molecular interactions. *Plant Biotechnology Reports*, 12(2), 77–92. <https://doi.org/10.1007/s11816-018-0480-0>
- He, J.-X., Gendron, J. M., Sun, Y., Gampala, S. S. L., Gendron, N., Sun, C. Q., & Wang, Z.-Y. (2005). BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science*, 307(5715), 1634–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1107580>
- Huang, H.-Y., Zhang, Q., Zhao, L.-P., Feng, J.-N., & Peng, C.-L. (2010). Does lutein play a key role in the protection of photosynthetic apparatus in Arabidopsis under severe oxidative stress? *Pakistan Journal of Botany*, 42(4), 2765–2774.
- Jin, H., Sun, Y., Yang, Q., Chao, Y., Kang, J., Jin, H., ... Margaret, G. (2010). Screening of genes induced by salt stress from Alfalfa. *Molecular Biology Reports*, 37(2), 745–753. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9590-7>
- Kang, C.-Y., Lian, H.-L., Wang, F.-F., Huang, J.-R., & Yang, H.-Q. (2009). Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(9), 2624–2641. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069765>
- Kaya, M. D., Ipek, A., & Öztürk, A. (2003). Effects of different soil salinity levels on germination and seedling growth of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 27(4), 221–227.
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, 37(8), 907–915. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>
- Kim, J. S., Kim, K. A., Oh, T. R., Park, C. M., & Kang, H. (2008). Functional characterization of DEAD-box RNA helicases in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *Plant and Cell Physiology*, 49(10), 1563–1571. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn125>
- Kim, T.-H., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N., & Schroeder, J. I. (2010). Guard cell signal transduction network: Advances in understanding abscisic acid, CO<sub>2</sub>, and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 561–591. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112226>
- Kim, T.-W., Guan, S., Burlingame, A. L., & Wang, Z.-Y. (2011). The CDG1 kinase mediates brassinosteroid signal transduction from BRI1 receptor kinase to BSU1 phosphatase and GSK3-like kinase BIN2. *Molecular Cell*, 43(4), 561–571. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.05.037>

- Kim, T.-W., Guan, S., Sun, Y., Deng, Z., Tang, W., Shang, J.-X., Sun, Y., Burlingame, A. L., & Wang, Z.-Y. (2009). Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nature Cell Biology*, *11*(10), 1254–1260. <https://doi.org/10.1038/ncb1970>
- Kollist, H., Nuhkat, M., & Roelfsema, M. R. G. (2014). Closing gaps: Linking elements that control stomatal movement. *New Phytologist*, *203*(1), 44–62. <https://doi.org/10.1111/nph.12832>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, *9*(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lee, S. C., Lan, W., Buchanan, B. B., & Luan, S. (2009). A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(50), 21419–21424. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910601106>
- Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, *12*, Article 323. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
- Li, J., & Chory, J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*, *90*(5), 929–938. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80357-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80357-8)
- Li, J., Wen, J., Lease, K. A., Doke, J. T., Tax, F. E., & Walker, J. C. (2002). BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell*, *110*(2), 213–222. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00812-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00812-7)
- Linghu, B., Snitkin, E. S., Holloway, D. T., Gustafson, A. M., Xia, Y., & DeLisi, C. (2008). High-precision high-coverage functional inference from integrated data sources. *BMC Bioinformatics*, *9*, Article 119. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-119>
- Linghu, B., Snitkin, E. S., Hu, Z., Xia, Y., & DeLisi, C. (2009). Genome-wide prioritization of disease genes and identification of disease-disease associations from an integrated human functional linkage network. *Genome Biology*, *10*(9), Article R91. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-9-r91>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), Article 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Mao, J., Zhang, Y. C., Sang, Y., Li, Q. H., & Yang, H. Q. (2005). A role for Arabidopsis cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(34), 12270–12275. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501011102>
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, *59*, 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Mustafa, G., Akhtar, M. S., & Abdullah, R. (2019). Global concern for salinity on various agro-ecosystems. In M. S. Akhtar (Ed.), *Salt stress, microbes, and plant interactions: Causes and solution: Volume 1* (pp. 1–19). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-8801-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8801-9_1)

- Nam, K. H., & Li, J. (2002). BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell*, *110*(2), 203–212. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00814-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00814-0)
- Olinares, P. D. B., Kim, J., & van Wijk, K. J. (2011). The Clp protease system: A central component of the chloroplast protease network. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1807*(8), 999–1011. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.12.003>
- Pandey, J. K., Dash, S. K., & Biswal, B. (2017). Loss in photosynthesis during senescence is accompanied by an increase in the activity of  $\beta$ -galactosidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*: Modulation of the enzyme activity by water stress. *Protoplasma*, *254*(4), 1651–1659. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1061-0>
- Paniego, N., Echaide, M., Muñoz, M., Fernández, L., Torales, S., Faccio, P., Fuxan, I., Carrera, M., Zandomeni, R., Suárez, E. Y., & Hopp, H. E. (2002). Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome*, *45*(1), 34–43. <https://doi.org/10.1139/g01-120>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Post-Beittenmiller, D. (1996). Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *47*(1), 405–430. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.405>
- Rani, P., & Singh, N. (2014). Senescence and postharvest studies of cut flowers: A critical review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, *37*(2), 159–201.
- Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H., & Vilo, J. (2019). g:Profiler: A web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Research*, *47*(W1), W191–W198. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz369>
- Rauf, S., Jamil, N., Tariq, S. A., Khan, M., Kausar, M., & Kaya, Y. (2017). Progress in modification of sunflower oil to expand its industrial value. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*(7), 1997–2006. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8214>
- Rodríguez-Concepción, M., & Boronat, A. (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology*, *130*(3), 1079–1089. <https://doi.org/10.1104/pp.007138>
- Rodríguez-Concepción, M., & Boronat, A. (2015). Breaking new ground in the regulation of the early steps of plant isoprenoid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, *25*, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.04.001>
- Rodríguez-Concepción, M., D'Andrea, L., & Pulido, P. (2019). Control of plastidial metabolism by the Clp protease complex. *Journal of Experimental Botany*, *70*(7), 2049–2058. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery441>
- Rodríguez-Hernández, A. A., Ortega-Amaro, M. A., Delgado-Sánchez, P., Salinas, J., & Jiménez-Bremont, J. F. (2014). AtGRDP1 gene encoding a glycine-rich domain protein is involved in germination and responds to ABA signalling. *Botanical Studies*, *55*(1), 36. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-36>

- Sato, A., Sato, Y., Fukao, Y., Fujiwara, M., Umezawa, T., Shinozaki, K., Hibi, T., Taniguchi, M., Miyake, H., Goto, D. B., & Uozumi, N. (2009). Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochemical Journal*, 424(3), 439–448. <https://doi.org/10.1042/BJ20091221>
- Schmitzer, V., Veberic, R., Osterc, G., & Stampar, F. (2010). Color and phenolic content changes during flower development in groundcover rose. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135(3), 195–202. <https://doi.org/10.21273/JASHS.135.3.195>
- Schroda, M., Kropat, J., Oster, U., Rüdiger, W., Vallon, O., Wollman, F.-A., & Beck, C. F. (2001). Possible role for molecular chaperones in assembly and repair of photosystem II. *Biochemical Society Transactions*, 29(4), 413–418. <https://doi.org/10.1042/bst0290413>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Sharifi Alishah, M., Darvishzadeh, R., Ahmadabadi, M., Piri Kashtiban, Y., & Hasanpur, K. (2022). Identification of differentially expressed genes in salt-tolerant oilseed sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotype by RNA sequencing. *Molecular Biology Reports*, 49(5), 3583–3596. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07198-3>
- Shi, H. (2007). Integration of Ca<sup>2+</sup> in plant drought and salt stress signal transduction pathways. In M. A. Jenks, P. M. Hasegawa, & S. M. Jain (Eds.), *Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops* (pp. 141–154). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5578-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5578-2_7)
- Small, I. D., & Peeters, N. (2000). The PPR motif—A TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(2), 46–47. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01520-0](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01520-0)
- Song, Y., Li, J., Sui, Y., Han, G., Zhang, Y., Guo, S., & Sui, N. (2020). The sweet sorghum SbWRKY50 is negatively involved in salt response by regulating ion homeostasis. *Plant Molecular Biology*, 102(6), 603–614. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-00966-4>
- Soon, F.-F., Ng, L.-M., Zhou, X. E., West, G. M., Kovach, A., Tan, M. H. E., Suino-Powell, K. M., He, Y., Xu, Y., Chalmers, M. J., Brunzelle, J. S., Zhang, H., Yang, H., Jiang, H., Li, J., Yong, E.-L., Cutler, S., Zhu, J.-K., Griffin, P. R., ... Xu, H. E. (2012). Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. *Science*, 335(6064), 85–88. <https://doi.org/10.1126/science.1215106>
- Sun, Y., Han, Z., Tang, J., Hu, Z., Chai, C., Zhou, B., & Chai, J. (2013). Structure reveals that BAK1 as a co-receptor recognizes the BRI1-bound brassinolide. *Cell Research*, 23(11), 1326–1329. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.131>
- Székely, G., Ábrahám, E., Cséplő, Á., Rigó, G., Zsigmond, L., Csiszár, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jásik, J., Schmelzer, E., Koncz, C., & Szabados, L. (2008). Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline

- biosynthesis. *The Plant Journal*, 53(1), 11–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03318.x>
- Tang, W., Yuan, M., Wang, R., Yang, Y., Wang, C., Oses-Prieto, J. A., Kim, T.-W., Zhou, H.-W., Deng, Z., Gampala, S. S., Gendron, J. M., Jonassen, E. M., Lillo, C., DeLong, A., Burlingame, A. L., Sun, Y., & Wang, Z.-Y. (2011). PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nature Cell Biology*, 13(2), 124–131. <https://doi.org/10.1038/ncb2151>
- von Mering, C., Huynen, M., Jaeggi, D., Schmidt, S., Bork, P., & Snel, B. (2003). STRING: A database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 258–261. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg034>
- Wang, J., Yang, J., Mao, S., Chai, X., Hu, Y., Hou, X., Tang, Y., Bi, C., & Li, X. (2014). MitProNet: A knowledgebase and analysis platform of proteome, interactome and diseases for mammalian mitochondria. *PLOS ONE*, 9(10), Article e111187. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111187>
- Wang, L., Yang, R., & Sun, J. (2022). Regulation of crop agronomic traits and abiotic stress responses by brassinosteroids: A review. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao = Chinese Journal of Biotechnology*, 38(1), 34–49. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.210236>
- Wang, W., Chen, Q., Botella, J. R., & Guo, S. (2019). Beyond light: Insights into the role of constitutively photomorphogenic1 in plant hormonal signaling. *Frontiers in Plant Science*, 10, 557. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00557>
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9(5), 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.006>
- Wang, X., & Chory, J. (2006). Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science*, 313(5790), 1118–1122. <https://doi.org/10.1126/science.1127593>
- Wang, X., Kota, U., He, K., Blackburn, K., Li, J., Goshe, M. B., Huber, S. C., & Clouse, S. D. (2008). Sequential transphosphorylation of the BRI1/BAK1 receptor kinase complex impacts early events in brassinosteroid signaling. *Developmental Cell*, 15(2), 220–235. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.06.011>
- Wang, Z.-Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S., & Chory, J. (2001). BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature*, 410(6826), 380–383. <https://doi.org/10.1038/35066597>
- Wei, Z., & Li, J. (2020). Regulation of brassinosteroid homeostasis in higher plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 583622. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.583622>
- Wilson, R. H., & Hayer-Hartl, M. (2018). Complex chaperone dependence of Rubisco biogenesis. *Biochemistry*, 57(23), 3210–3216. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00399>
- Xiang, S., Usunow, G., Lange, G., Busch, M., & Tong, L. (2013). 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS), a crucial enzyme for isoprenoids biosynthesis. *Chinese Science Bulletin*, 58(4–5), 394–401. <https://doi.org/10.1007/s11434-012-5542-4>

- Xie, T., Ren, R., Zhang, Y.-Y., Pang, Y., Yan, C., Gong, X., He, Y., Li, W., Miao, D., Hao, Q., Deng, H., Wang, Z., Wu, J.-W., & Yan, N. (2012). Molecular mechanism for inhibition of a critical component in the Arabidopsis thaliana abscisic acid signal transduction pathways, SnRK2.6, by protein phosphatase ABI1. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(1), 794–802. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.313106>
- Xing, H., Fu, X., Yang, C., Tang, X., Guo, L., Li, C., Xu, C., & Luo, K. (2018). Genome-wide investigation of pentatricopeptide repeat gene family in poplar and their expression analysis in response to biotic and abiotic stresses. *Scientific Reports*, 8(1), 2817. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21269-1>
- Yamauchi, Y., Hasegawa, A., Taninaka, A., Mizutani, M., & Sugimoto, Y. (2011). NADPH-dependent reductases involved in the detoxification of reactive carbonyls in plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(9), 6999–7009. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.191940>
- Yang, S. F., & Hoffman, N. E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), 155–189. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.35.1.155>
- Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T., & Chory, J. (2005). A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in Arabidopsis. *Cell*, 120(2), 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.044>
- Zhang, T., Chen, S., & Harmon, A. C. (2014). Protein phosphorylation in stomatal movement. *Plant Signaling & Behavior*, 9(10), e972850. <https://doi.org/10.4161/15592316.2014.972850>
- Zhang, X., Jiang, T., Yu, Y., Wu, Z., Jiang, S., Lu, K., Feng, X., Liang, S., Shen, S., Hou, W., Liu, X., & Zhang, D. (2014). Arabidopsis co-chaperonin CPN20 antagonizes Mg-chelatase H subunit to derepress ABA-responsive WRKY40 transcription repressor. *Science China Life Sciences*, 57(1), 11–21. <https://doi.org/10.1007/s11427-013-4587-8>