

Role of AT2G37050 gene in response to cadmium ion in *Arabidopsis thaliana*

Omid Jazayeri

*Assistant Professor, Department of molecular and cell biology, Faculty of Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran. Fax: 011- 35302450, Email: o.jazayeri@umz.ac.ir

Tahereh A. Aghajanzadeh

Assistant Professor, Department of biology, Faculty of Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran. Email: t.aghajanzadeh@umz.ac.ir

Parviz Heidari

Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran. Email: parvizh63@gmail.com

Theo Elzenga

Professor, Laboratory of Plant Physiology, Faculty of Science and Engineering, University of Groningen, Groningen, the Netherlands. Email: j.t.m.elznga@rug.nl

Abstract

Objective

Cadmium is a highly toxic and widespread soil pollutant threatening human and animal. Plants effectively help to eliminate environmental pollution by up taking of heavy metals and tolerate cadmium stress through a variety of mechanisms, but biochemical pathways and genes involved in the response of plants to cadmium stress have not been fully and comprehensively identified.

Materials and methods

Following proteomic studies on the *Arabidopsis thaliana* mutant in which *AT2G37050* (receptor like kinase gene) was knocked-out, it was identified that 150 proteins that were present in the wild (control) plant have been disappeared in the mutant plant. In current study, biological function of *AT2G37050* gene/GO terms has been investigated by GeneMANIA and agriGO algorithms. GO term is a controlled vocabulary system

describing biological entities in three aspects (biological process, molecular function, and cellular component) in different organisms.

Results

Bioinformatics studies resulted from the GeneMANIA algorithm showed that the *AT2G37050* gene is involved in the biological process of response to cadmium ion. The agriGO algorithm was then used to study GO terms at three levels of biological process, molecular function and cellular component, and role of the *AT2G37050* gene and biological process of response to cadmium ion was reconfirmed. In addition, significant GO terms (FDR <0.05) such as "extracellular region", "plasmodesmata", "vacuole membrane" and "chloroplast" are associated with the mechanisms involved in plant tolerance to cadmium stress. This is another supporting evidence, which shows association of *AT2G37050* gene and "response to cadmium ion".

Conclusions

In addition to suggesting a new effective gene in response to cadmium stress, the result of current study can be considered in order to construction of transgenic plants, which are able to purify soil from cadmium contamination.

Keywords: Functional genomics, *Arabidopsis thaliana*, Bioinformatics, Response to cadmium ion, *AT2G37050*.

Citation: Jazayeri O, Aghajanzadeh TA, Heidari P, Elzenga T (2019) Role of *AT2G37050* gene in response to cadmium ion in *Arabidopsis thaliana*. *Agriculture Biotechnology Journal* 12(1), 1-22.

Agricultural Biotechnology Journal 12(1), 1-22.

DOI: 10.22103/jab.2020.14672.1166

Received: November 16, 2019; Accepted: January 15, 2020

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

نقش ژن *AT2G37050* در پاسخ به یون کادمیوم در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا

امید جزایری

* نویسنده مسئول استادیار گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

دورنگار ۰۱۱۳۵۳۰۲۴۵۰ ایمیل: o.jazayeri@umz.ac.ir

طاهره السادات آقاجزاده

استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران ایمیل: T.Aghajanzadeh@umz.ac.ir

پرویز حیدری

استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران ایمیل:

heidari@shahroodut.ac.ir

تئو الزنگا

استاد گروه فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی و مهندسی، دانشگاه گرونینگن، گرونینگن، هلند ایمیل:

j.t.m.elznga@rug.nl

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۲۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲۵

چکیده

هدف: کادمیوم یکی از عناصر سنگین موجود در خاک است که در صورت افزایش غلظت در خاک به عنوان یکی از آلاینده‌های زیست محیطی منجر به تهدید سلامت انسان و حیوانات نیز می‌گردد. در حالی که گیاهان با افزایش جذب عناصر سنگین کمک مؤثری در رفع آلودگی‌های محیطی به عمل آورده و از طرفی دیگر به کمک سازوکارهای متنوعی با تنش کادمیوم مقابله مینمایند، اما تاکنون مسیرهای بیوشیمیایی و ژن‌هایی که در پاسخ گیاهان به کادمیوم دخیل می‌باشند، به طور کامل شناسائی نشده‌اند.

مواد و روش‌ها: به دنبال مطالعات پروتئومیک انجام شده بر روی گیاه آرابیدوپسیس تالیانای جهش‌یافته که ژن شبه رسپتور کینازی *AT2G37050* آن از کار افتاده، مشخص گردید ۱۵۰ پروتئین که در گیاه وحشی (شاهد) حضور داشته‌اند، در گیاه جهش‌یافته ناپدید شدند. در این تحقیق از الگوریتم‌های GeneMANIA و agriGO جهت مطالعه GO term استفاده شد که

یک سیستم کنترل شده از واژگان زیستی است و ماهیت واژگان زیستی در سه حوزه ۱- فرآیند زیستی ۲- عملکرد مولکولی ۳- بخش بندی سلولی توسط افراد متخصص تعریف می‌شود.

نتایج: مطالعات بیوانفورماتیک به دست آمده با استفاده از الگوریتم GeneMANIA نشان داد که ژن *AT2G37050* در فرآیند زیستی پاسخ گیاه به یون کادمیوم نقش دارد. در مرحله بعد الگوریتم agriGO به منظور مطالعه GO terms مورد استفاده قرار گرفت و در نتیجه نقش ژن *AT2G37050* در فرآیند زیستی پاسخ به یون کادمیوم مجدداً مورد تایید قرار گرفت. علاوه بر این، وجود GO term های معنادار ($FDR < 0.05$) از جمله مکان خارج سلولی، پلاسمودسماتا، غشاء واکوئل و کلروپلاست که در ارتباط با سازوکارهای دخیل در تحمل گیاه به تنش کادمیوم می‌باشند، دلیل تقویت کننده دیگری در خصوص ارتباط این ژن در پاسخ به یون کادمیوم می‌باشد.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق علاوه بر پیشنهاد ژن جدید مؤثر در پاسخ به تنش کادمیوم می‌تواند در ساخت گیاهان تراریخته تصفیه کننده خاک از آلودگی کادمیوم مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: آرابیدوپسیس تالیانا، بیوانفورماتیک، پاسخ به کادمیوم، ژنومیک عملکردی، *AT2G37050*

مقدمه

افزایش غلظت عناصر سنگین موجود در خاک به عنوان یکی از مشکلات زیست محیطی مطرح می‌باشد که علاوه بر دخالت در ترکیب و حاصلخیزی خاک بر تنوع گیاهان منطقه نیز مؤثر است. کادمیوم به عنوان یک فلز سنگین در صورت افزایش مصرف به عنوان یک ماده سرطان زا عمل کرده، سلامت انسان را از طریق زنجیره غذایی مورد تهدید قرار می‌دهد، همچنین یکی از عوامل شایع آلودگی خاک بوده و رشد گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Bertin and Averbek 2006; Song et al. 2017). افزایش میزان کادمیوم در خاک عموماً در اثر فعالیت‌های صنعتی از قبیل معدن کاری، ذوب فلزات، استفاده از کودهای شیمیایی و علف کشها اتفاق می‌افتد (Redondo-Gomez et al. 2010). یون کادمیوم از طریق هر دو مسیر سیمپلاستی و آپوپلاستی قادر به انتقال و توزیع در ریشه، ساقه و برگ می‌باشد (Song et al. 2017). کادمیوم به طور مستقیم یا غیر مستقیم برخی از فرآیندهای فیزیولوژیک از قبیل فتوسنتز، متابولیسم ازت، توزیع مواد غذایی، جوانه زنی دانه، تنفس گیاهی (Di Toppi and Gabbrielli 1999) جذب اتم آهن (Zhai et al. 2014)، فرآیند دفاع عمومی گیاه، پاسخ به شرایط تنش و متابولیسم کربوهیدرات (Marmioli et al. 2013) را تحت تأثیر قرار داده و منجر به تاخیر در رشد و کاهش بیومس^۱ در گیاه میشود. در گیاهان سازوکارهای آغازین مقابله با سمیت کادمیوم شامل مواردی از قبیل انتقال کادمیوم به خارج از سلول و یا محدود کردن کادمیوم به داخل واکوئل (جلوگیری از اثر سمی آن در سیتوپلاسم سلول)، مهار اثر سمی کادمیوم بوسیله متالوتیونین‌ها^۲ و

¹ Biomass

² Metallothionein

تولید زیستی^۳ ترکیبات کلاته کننده مانند گلوکاتینون و فیتوکلانتینها می باشد (DalCorso et al. 2010). علاوه بر اینکه سازوکارهای ذکر شده به برخی گونه های گیاهی کمک می کنند تا تنش کادمیوم را تحمل نمایند، موجب تجمع کادمیوم در پیکر گیاهان شده و به نوعی در پالایش محیط به وسیله گیاهان^۴ به کار گرفته می شوند (Redondo-Gomez et al. 2010). البته هنوز مکانیسم ها، مسیرهای بیوشیمیایی و ژن هایی که در پاسخ گیاهان به کادمیوم دخیل هستند به خوبی شناسائی نشده اند. درک و شناسایی پاسخ های القایی گیاهان به دنبال مواجهه با سمیت کادمیوم در انتخاب و دستکاری ژنتیکی گیاهان به منظور تولید گیاهان مقاوم به کادمیوم ضروری است.

گیاهان در طبیعت به طور دائم در معرض عوامل تنش زای محیطی مختلف شامل خشکی، نوسانات شدید دمایی، سیل، شوری و آلودگی خاک با فلزات سنگین هستند و از آنجائیکه نمی توانند موقعیت مکانی خود را مانند سایر موجودات زنده تغییر دهند به منظور سازگاری و پاسخ سریع به تغییرات محیطی طی فرآیند تکامل مکانیسم های دفاعی متنوعی در آنها تعبیه شده است (Stavridou et al. 2018). در این راستا پاسخ های دفاعی گیاه *Arabidopsis thaliana*^۵ در مقابل تنش های غیرزنده محیطی در مقاله ای مروری گزارش شده است (Provart et al. 2016). در این تحقیق، گیاه *Arabidopsis thaliana* به عنوان گیاه مدل انتخاب و ژن های دخیل در پاسخ به کادمیوم در این گیاه مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به وجود بانک های بیوانفورماتیکی متعدد در خصوص گیاه *Arabidopsis thaliana*، این گیاه مدل بسیار مناسبی در مطالعات مولکولی گیاهی به شمار می رود و از مطالعات بیوانفورماتیکی جهت بررسی عملکردهای مختلف یک ژن و مسیرهای بیوشیمیایی مختلف در گیاهان استفاده می گردد. برای مثال Yada & Mani (2019) با بررسی بیوانفورماتیکی هشتادوپنج فاکتور رونویسی متعلق به خانواده bHLH و ترسیم ارتباط زیستی بین این فاکتورها، ۵ فاکتور رونویسی را به عنوان فاکتور رونویسی شاخص و محوری در مواجهه گیاه نخود با تنش کادمیوم معرفی نمودند. در تحقیقی دیگر Liu et al. (2019) با مقایسه بیوانفورماتیکی بیان ژن ها در تحقیقات مختلف مرتبط با استرس فلزات سنگین، نهایتاً ۹ ژن محوری مشترک در پاسخ به عناصر کادمیوم، سرب و مس را مطرح و سپس این پیش گوئی بیوانفورماتیکی را در آزمایشگاه به اثبات رساندند. استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی می تواند جنبه های جدیدی از عملکرد و رابطه ژن ها را مشخص کند که در مطالعات ژنومیک عملکردی می تواند مورد استفاده قرار گیرد (Heidari et al. 2019). در تحقیق حاضر با بهره گیری از یک شبکه ترکیبی زیستی^۶ شامل برهم کنش پروتئین با پروتئین، مسیرهای بیوشیمیایی، بیان همزمان ژن ها^۷، هم مکانی پروتئین ها در یک اندامک^۸ و آنالیز غنی شدگی ژن های مرتبط با هم^۹ (Zuberi et al. 2013; Jazayeri et

³ Biosynthesis

⁴ Phytoremediation

⁵ *Arabidopsis thaliana*

⁶ Composite biological network

⁷ Co-expression

⁸ Co-localization

⁹ Enrichment analysis

(al. 2017) با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی، عملکردهای زیستی یک ژن که از کار انداخته شده^{۱۰} (*AT2G37050*) بود در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا مورد بررسی قرار گرفت و برای اولین بار نقش این ژن در پاسخ به یون کادمیوم مطرح گردید. آنالیز غنی‌شدگی روش مناسبی برای تشخیص عملکرد^{۱۱} یک لیست بزرگ از ژن‌ها است، برای مثال در مطالعات بیان ژن با روش microarray بیان همه ژن‌ها در سلول در شرایط خاصی مورد بررسی قرار گرفته و سپس همه ژن‌هایی که به میزان زیادی بیان شده‌اند در قالب یک لیست از لحاظ غنی‌شدگی مورد آنالیز قرار می‌گیرند تا مشخص شود ژن‌های موجود در لیست با چه فرآیندهای زیستی و یا مسیرهای بیوشیمیایی یا اندامک سلولی مرتبط هستند. به‌طور کلی، تحقیق حاضر یک چهارچوب کلی جهت مطرح نمودن یک فرضیه به کمک اطلاعات بیوانفورماتیکی و سپس اثبات آن در آزمایشگاه را ارائه می‌دهد.

مواد و روش‌ها

لیست ژن‌های ورودی شبکه زیستی: آنالیز پروتئومیک گیاه آرابیدوپسیس تالیانا که ژن *AT2G37050* در آن از کار افتاده بود، عدم حضور ۱۵۰ پروتئین در مقایسه با گیاه شاهد را نشان داد (داده‌ها چاپ نشده). دانه‌های این موتانت که در آن ژن مورد نظر با روش T-DNA insertion از کار افتاده بود از مرکز^{۱۲} NASC تهیه گردید. این ۱۵۰ پروتئین ناپدید شده به علاوه پروتئین *AT2G37050* به‌عنوان ورودی الگوریتم GeneMANIA به‌کار گرفته شد و در فایل تکمیلی این مقاله قابل دسترس است (فایل تکمیلی ST1).

ایجاد شبکه زیستی ترکیبی به‌وسیله الگوریتم GeneMANIA: به‌منظور یافتن فرآیندهای زیستی محتمل برای ژن *AT2G37050* شبکه زیستی ترکیبی به‌کمک الگوریتم GeneMANIA ترسیم شد. در ترسیم این شبکه از بانک‌های بیوانفورماتیکی متعدد به‌کار گرفته شده توسط الگوریتم GeneMANIA استفاده شد (Database version 12-08-2014, *Arabidopsis thaliana*). این بانک‌های بیوانفورماتیکی تصویر جامعی از ارتباطات زیستی بین ژن‌ها و یا پروتئین‌ها را نشان می‌دهند (Zuberi et al., 2013). در این مجموعه، ارتباطات زیستی شامل مواردی از قبیل برهم‌کنش فیزیکی پروتئین-پروتئین، پیش‌گوی برهم‌کنش پروتئین-پروتئین، وجود مسیرهای بیوشیمیایی مشترک، بیان همزمان ژن‌ها، هم‌مکانی پروتئین‌ها در یک اندامک و وجود دُمین^{۱۳} پروتئینی مشابه است. درحالت برهم‌کنش فیزیکی پروتئین-پروتئین تماس فیزیکی دو پروتئین که با روش‌های آزمایشگاهی قبلاً به‌اثبات رسیده‌است نمایش داده می‌شود اما درحالت پیش‌گوئی برهم‌کنش پروتئین-پروتئین امکان اتصال فیزیکی دو پروتئین پیش‌گوئی می‌شود، مثلاً برهم‌کنش دو پروتئین در موجود دیگری به‌اثبات رسیده‌است اما تاکنون در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا گزارش نشده‌است. به‌منظور ترسیم واضح‌تری از شبکه زیستی، نرم‌افزار CytoScape plugin v 3.4.0

¹⁰ knocked-out gene

¹¹ Functional characterization

¹² Nottingham *Arabidopsis* Stock Center

¹³ Domain

مورد استفاده قرار گرفت. این نرم افزار به طور گسترده‌ای برای نمایش داده‌های متنوع زیستی استفاده می‌شود (Saito et al. 2012).

آنالیز Gene ontology: ^{۱۴} GO term یک سیستم کنترل شده از واژگان زیستی است که در آن ماهیت واژگان زیستی در سه حوزه ۱- فرآیند زیستی ۲- عملکرد مولکولی ۳- بخش بندی سلولی توسط افراد متخصص تعریف می‌شود. بررسی GO terms در مطالعات عملکردی ژن‌ها و آنالیز غنی‌شدگی ^{۱۵} ژن‌های مرتبط با هم ویا غنی‌شدگی GO terms کاربرد گسترده‌ای دارد. در این تکنیک لیست بزرگی از ژن‌ها به گروه‌های کوچکتری که عملکرد زیستی مشابه‌ایی طبقه‌بندی می‌شوند ویا اینکه در یک لیست بزرگ از ژن‌های مختلف، GO termهایی که ارتباط موضوعی بیشتری با این لیست دارند مشخص می‌شود. در تحقیق حاضر از دو الگوریتم برای آنالیز GO terms جهت تکمیل اطلاعات بیوانفورماتیکی و استفاده از بانک‌های اطلاعاتی متنوع استفاده شد. ابتدا الگوریتم GeneMANIA جهت بررسی غنی‌شدگی ژن‌های مرتبط با هم و در سطح فرآیند زیستی ^{۱۶} مورد استفاده قرار گرفت که برای این منظور GO terms با ^{۱۷} FDR کوچکتر از ۰/۰۵ به عنوان GO term معنی‌دار در نظر گرفته شد. به وسیله این فاکتور آماری احتمال مطرح شدن یک یا چند فرضیه نادرست در زمانی که فرضیه‌های متعدد به طور همزمان انجام و تست می‌شود مورد بررسی قرار می‌گیرد. برای مثال، نسبت مثبت کاذب ۵ درصد (FDR = ۰/۰۵) به معنی این است که احتمالاً ۵ درصد از فرضیه‌هایی که واقعا نادرست هستند اشتباه‌ها درست و معنی‌دار در نظر گرفته می‌شوند.

در مرحله بعد از الگوریتم agriGO به منظور مطالعه GO terms در هر سه سطح عملکرد مولکولی ^{۱۸}، فرآیند زیستی و بخش بندی سلولی ^{۱۹} استفاده شد (Du et al. 2010). در بخش بندی سلولی وجود یک پروتئین در اندامک‌های مختلف سلولی گزارش می‌شود. الگوریتم agriGO قادر به بررسی ۳۸ نوع گیاه که از نظر کشاورزی حائز اهمیت می‌باشند، است (به بخش آدرس‌های اینترنتی مراجعه شود). بدین منظور از روش آنالیز ^{۲۰} SEA استفاده شد و گیاه آرابیدوپسیس تالیانا مدل (TAIR9) به عنوان گیاه رفرنس استفاده گردید.

¹⁴ Gene Ontology

¹⁵ Gene enrichment

¹⁶ Biological process

¹⁷ False discovery rate

¹⁸ Molecular function

¹⁹ Cellular component

²⁰ Singular enrichment analysis

نتایج و بحث

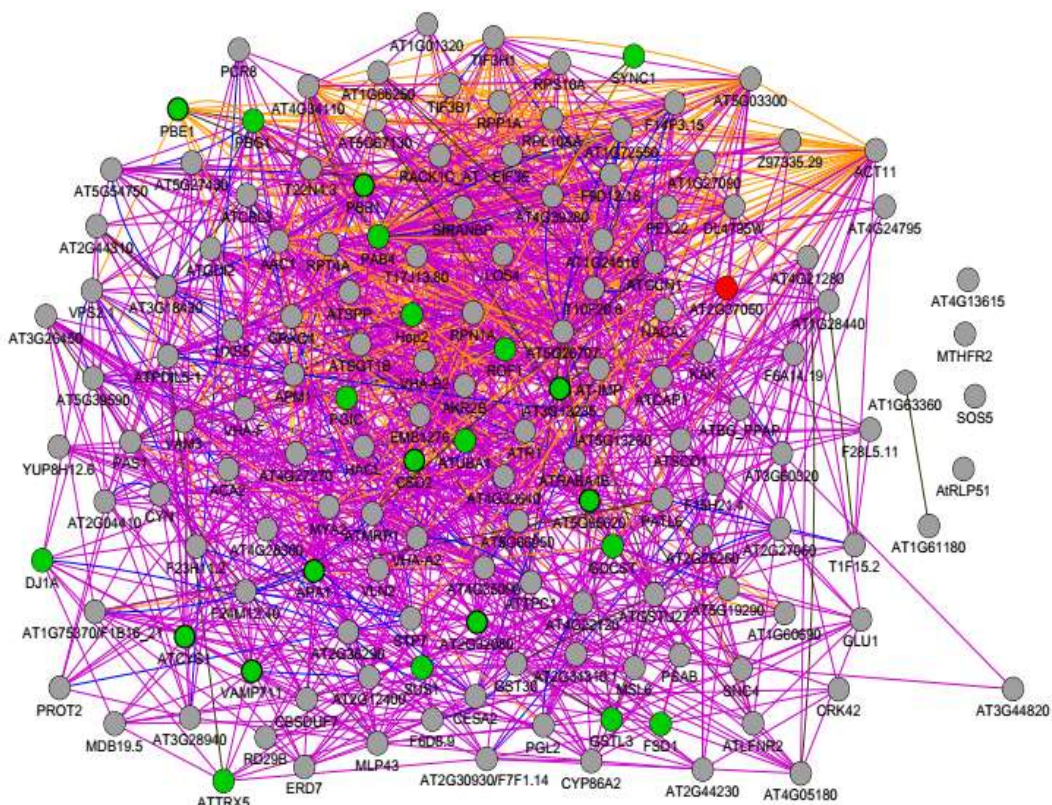
داده‌های پروتئینی مربوط به مطالعه پروتئومیک (داده‌ها چاپ نشده) نشان داد که در گیاه آرابیدوپسیس موتانت که ژن شبه رسپتورکینازی *AT2G37050* در آن از کار انداخته شده است^{۲۱}، ۱۵۰ پروتئین در مقایسه با گیاه وحشی (شاهد) ناپدید شده‌اند. شبکه زیستی ترکیبی حاصل از الگوریتم GeneMANIA که در آن ۱۵۱ ژن یا پروتئین توسط ۱۵۴۵ خط^{۲۲} (ارتباط زیستی) به هم متصل شده‌اند نشان داد (شکل ۱) که ۷۱/۴۷ درصد از ارتباطات زیستی از نوع بیان هم‌زمان دو ژن، ۱۷/۹۳ درصد از نوع پیش‌بینی برهم‌کنش پروتئین-پروتئین، ۷/۲۱ درصد برهم‌کنش فیزیکی پروتئین-پروتئین، ۳/۰۲ درصد بر اساس هم‌مکانی دو پروتئین در درون یک اندامک یکسان و ۰/۳۷ درصد بر اساس وجود دُمین پروتئینی مشترک بوده‌است. در جدول ۱ میزان غنی‌شدگی GO terms بر اساس الگوریتم GeneMANIA نشان داده شده‌است و بر این اساس فقط فرآیند زیستی "پاسخ به یون کادمیوم" از نظر آماری معنی‌دار بوده است ($FDR < 0.05$). اعداد این جدول این مفهوم را می‌رساند که در کل ژنوم آرابیدوپسیس تالیانا با ۲۸۳۹۷ نوع پروتئین مختلف ۲۸۸ ژن/پروتئین مرتبط با پاسخ به یون کادمیوم وجود دارد درحالی‌که از مجموعه ۱۵۰ پروتئین ناپدید شده ۱۴ پروتئین مرتبط با پاسخ به یون کادمیوم در این مجموعه قرار گرفته است. در واقع ما شاهد غنی‌شدگی پروتئین‌های مرتبط با فرآیند زیستی "پاسخ به یون کادمیوم" در این مجموعه ۱۵۰ پروتئینی هستیم که بیانگر نقش احتمالی ژن *AT2G37050* در پاسخ به یون کادمیوم است. در مرحله بعد، جهت یافتن مدارک تایید کننده این موضوع از الگوریتم *agriGO* استفاده گردید.

نتایج حاصل از این الگوریتم علاوه بر ۱۴ پروتئین قبلی ۶ پروتئین جدید را از مجموعه ۱۵۰ پروتئینی مورد بحث به لیست پروتئین‌های مرتبط با پاسخ به یون کادمیوم اضافه نمود (جدول ۲). در راستای یافتن مدارک تایید کننده بیشتر، ارتباط سایر ژن‌های باقیمانده این مجموعه با یون کادمیوم در پایگاه Google Scholar بررسی و نهایتاً دو پروتئین *SOD2* و *TOP1* به‌عنوان پروتئین‌های مرتبط با پاسخ به یون کادمیوم به لیست فوق اضافه گردید (جدول ۲). کاهش پروتئین *SOD2* در برگ و ریشه گیاه آرابیدوپسیس تالیانا به‌دنبال تیمار گیاه با گزارش شده‌است (Smeets et al. 2008). همچنین مشخص شده است که ژن *TOP1* به‌همراه برخی از ژن‌های دخیل در تجزیه پروتئولیتیک پروتئازوم^{۲۳} به‌دنبال استرس کادمیوم افزایش بیان داشته‌است (Polge et al. 2009).

²¹ Knockout

²² Edge

²³ Proteasome



شکل ۱. شبکه زیستی ترکیبی نشان دهنده ارتباطات زیستی بین ۱۵۰ پروتئین ناپدید شده به دنبال از کار افتادگی ژن *AT2G37050* (دایره قرمز رنگ). دایره‌های سبز رنگ نشانگر ژن‌های دخیل در پاسخ به کادمیوم بر اساس الگوریتم GeneMANIA است. دایره‌های سبز رنگی که با لبه سیاه رنگ مشخص شده‌اند، ژن‌های اضافی هستند که بر اساس الگوریتم agriGO و جستجوی مقالات به لیست ژن‌های پاسخ‌دهنده به کادمیوم اضافه گردید. خطوط بنفش رنگ نمایشگر هم‌پیمانی بین ژن‌ها، خطوط آبی رنگ نشاندهنده هم‌مکانی، خطوط نارنجی و خاکستری به ترتیب نشانگر پیشگویی بر همکنش پروتئین-پروتئین و دُمین پروتئینی مشترک هستند.

Figure 1. Biological network among 150 proteins which disappeared after knocking out *AT2G37050* gene (red node). The green nodes represent the genes which involved in response to cadmium on the basis of GeneMANIA algorithm. The extra responsive genes to cadmium ion which adapted from literature review or agriGO algorithm have been presented as green nodes with bold black border. The purple lines represent co-expression. The blue line exhibits co-localization. Orange and grey lines show predicted protein-protein interaction and shared protein domain, respectively.

جدول ۱. فرآیندهای زیستی غنی‌شده در میان ۱۵۰ پروتئین ناپدید شده به دنبال از کار افتادن ژن

AT2G37050 بر اساس الگوریتم GeneMANIA

Table 1. Enriched gene ontology terms in 150 disappeared proteins after knock out of *AT2G37050* gene

شماره کُد Gene Ontology	فرآیند زیستی / عملکرد مولکولی Biological process/molecular function	FDR	تعداد در میان ژن / پروتئین Occurrences in 150 genes	تعداد در میان کل ژنوم گیاه <i>A.thaliana</i> Occurrences in Genome
GO:0046686	پاسخ به یون کادمیوم response to cadmium ion	3.96E-05	14	288
GO:0000502	کمپلکس پروتئازوم proteasome complex	0.121357434	5	50
GO:0051603	پروتئولیز دخیل در فرآیند کاتابولیک پروتئین proteolysis involved in cellular protein catabolic process	0.121357434	8	206
GO:0006511	فرآیند کاتابولیک پروتئین وابسته به یوبی کوئیتین ubiquitin-dependent protein catabolic process	0.121357434	8	196

در پاسخ به تحریکات محیطی، یوبی کوئیتین شدن^{۲۴} پروتئین‌هایی از قبیل فاکتورهای رونویسی نهایتاً منجر به کاهش یا افزایش بیان برخی از ژن‌ها و پاسخ سلولی مناسب می‌گردد. در واقع کنترل و تغییر هدفمند مقدار پروتئین‌ها به گیاه اجازه می‌دهد تا با تنظیم سیگنالینگ، پاسخ مناسبی به تنش‌های خارجی بدهد. در طی فرآیند یوبی کوئیتین شدن پروتئین کوچکی به نام یوبیکوئیتین^{۲۵} به پروتئین‌های مشخصی متصل شده و نهایتاً موجب تجزیه این پروتئین‌ها توسط کمپلکس پروتئازوم می‌شود. نقش

²⁴ Ubiquitination

²⁵ Ubiquitin

یوبی کوئیتینه شدن در افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های غیر زنده از قبیل تنش خشکی، شوری، کم آبی و اسمری به اثبات رسیده است (Wan et al. 2011; Dametto et al. 2015; Stone 2019). به‌عنوان مثال، افزایش بیان ژن *UBC1* با یوبی کوئیتینه کردن برخی پروتئین‌ها و فعال‌سازی کمپلکس پروتازوم 26 S یا 20 S نهایتاً منجر به افزایش تحمل به تنش کادمیوم و همچنین کاهش استرس اکسیداتیو در گیاه توتون شده‌است (Bahmani et al. 2017). همچنین تنش کادمیوم در گوجه فرنگی موجب افزایش بیان برخی از پروتئین‌های کمپلکس 20 S پروتازوم و هضم پروتئین‌های صدمه‌دیده حاصل از تنش کادمیوم شد (Djebali et al. 2008). در گیاه ذرت نیز تنش کادمیوم با افزایش یوبی کوئیتینه شدن پروتئین‌های صدمه‌دیده و هضم این پروتئین‌ها توسط کمپلکس 20 S پروتازوم همراه بود (Pena et al. 2007). حضور سه پروتئین PBE1، DDI1 و ATUBA1 در جدول ۱ که در فرآیند یوبی کوئیتینه شدن و کمپلکس پروتازوم نقش دارند، مدرکی در تایید نقش ژن *AT2G37050* در پاسخ به تنش کادمیوم است. از طرفی دیگر افزایش بیان این سه ژن در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا در شرایط تنش کادمیوم مشاهده گردید (Sarry et al. 2006). دو پروتئین PBG1 و PBB1 نیز که از اجزای تشکیل دهنده کمپلکس پروتازوم در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا محسوب می‌شوند در جدول ۱ ذکر شده‌اند (Kurepa and Smalle 2008).

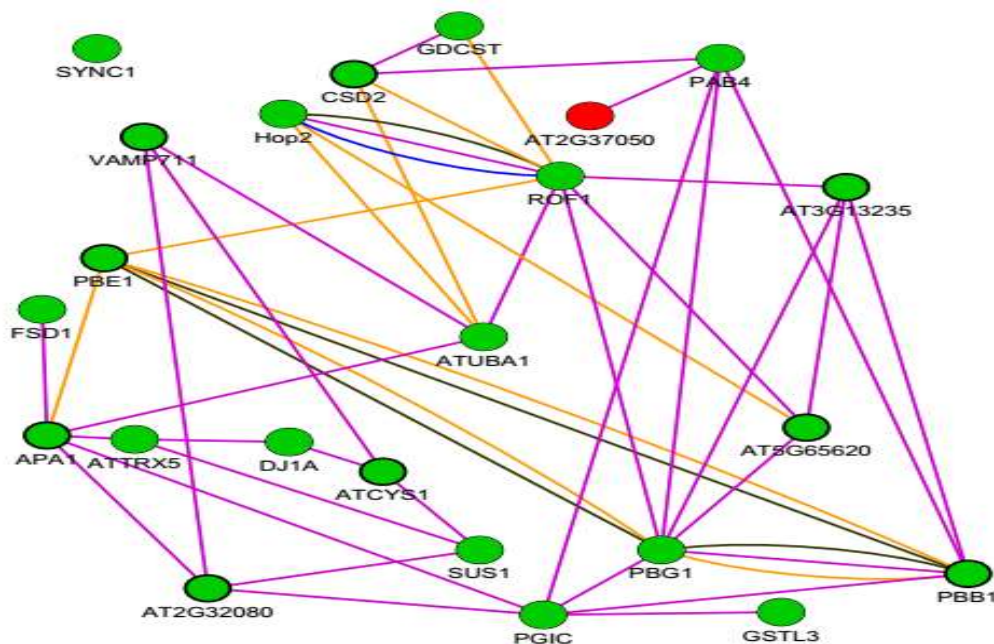
در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا افزایش بیان ژن‌های *GDCST* و *SYN1* در مواجهه با تنش کادمیوم گزارش شده است (Sarry et al. 2006). افزایش بیان ژن *GDCST* در گیاه برنج و در شرایط تنش شوری نیز به اثبات رسیده است (Wang et al. 2017). لازم به ذکر است پروتئین *GDCST* در شرایط استرس حرارتی دچار سامولیشن^{۲۶} شده، در این حالت پپتید کوچکی به نام SUMO^{۲۷} به پروتئین هدف متصل می‌گردد. این فرآیند شبیه به یوبی کوئیتینه شدن بوده و در پاسخ گیاه به تنش‌های مختلف از قبیل تنش حرارتی، تنش اکسیداتیو (H_2O_2)، تنش خشکی، تنش سرما و تنش ناشی از عوامل بیماری‌زا گزارش شده‌است (Park et al. 2011).

افزایش بیان ژن‌های *SUS1* (ساکاروز سنتتاز ۱) و *PGIC* (گلوکز ۶ فسفات ایزومراز) که هر دو در متابولیسم قند نقش دارند به‌دنبال تنش کادمیوم گزارش شده‌است (Sarry et al. 2006). همچنین افزایش بیان ژن *SUS1* در گیاه کلم گونه پاراکینزیس^{۲۸} که قادر به تجمع مقادیر بالایی از یون کادمیوم در سلول‌های خود می‌باشد اخیراً به اثبات رسیده است (Zhou et al. 2019). لازم به ذکر است پروتئین‌های *SUS1*، *PGIC* و *VAMP711* که همگی در جدول یک ذکر شده‌اند قادر به یوبی کوئیتینه شدن بوده و احتمالاً از طریق مسیر یوبی کوئیتین - پروتازوم تنظیم می‌گردند (Manzano et al. 2008).

²⁶ Sumoylation

²⁷ Small ubiquitin modifier peptide

²⁸ *Brassica parachinensis*



شکل ۲. شبکه زیستی ترکیبی نشاندهنده ارتباطات زیستی بین ۲۲ ژن/پروتئین مرتبط با فرایند زیستی "پاسخ به یون کادمیوم". دایره قرمز رنگ نشاندهنده ژن *AT2G37050* که از کار افتاده شده است. دایره‌های سبز رنگ نشانگر ژن‌های دخیل در پاسخ به کادمیوم بر اساس الگوریتم GeneMANIA است. دایره‌های سبز رنگی که با لبه سیاه رنگ مشخص شده‌اند، ژن‌های اضافه‌ای است که بر اساس الگوریتم *agriGO* و جستجوی مقالات به لیست ژن‌های پاسخ‌دهنده به یون کادمیوم اضافه گردید (لیست و منبع ژن‌ها در جدول ۲ ذکر شده است). خطوط بنفش رنگ نمایشگر هم‌بیانی بین ژن‌ها، خطوط آبی رنگ نشاندهنده هم‌مکانی، خطوط نارنجی و خاکستری به ترتیب نشانگر پیشگویی بر همکنش پروتئین-پروتئین و دُمین پروتئینی مشترک هستند.

Figure 2. Biological network representing the connections among 22 genes which involving in "response to cadmium ion". Red node shows *AT2G37050* (Knocked-out gene). The green nodes represent the genes which involved in response to cadmium on the basis of GeneMANIA. The extra responsive genes to cadmium ion which adapted from literature review and *agriGO* algorithm have been presented as green nodes with bold black border. The purple lines represent co-expression. The blue line exhibits co-localization. Orange and grey lines show predicted protein-protein interaction and shared protein domain, respectively.

همچنین کاهش بیان ژن‌های *ROF1* و *PUR ALPHA-1* در شرایط تنش کادمیوم گزارش شده است (Sarry et al. 2006). در همین راستا (Yu et al. 2018) در یک مطالعه پرتئومیک نشان دادند که مقدار فاکتور رونویسی *PUR ALPHA-1* در ریشه گیاه *Puccinellia tenuiflora* تحت تنش H_2O_2 کاهش می‌یابد. همچنین کاهش پروتئین *ROF1* منجر به افزایش تحمل گیاه آراییدوپسیس به تنش حرارتی می‌گردد (Meiri et al. 2010). این امکان وجود دارد که تنش کادمیوم نیز به‌عنوان یک تنش غیر زنده از همین رفتار تبعیت کند. حضور پروتئین *GSTL3* که در خانواده گلوپتایون *S* ترانسفرازها قرار دارد می‌تواند تأییدی دیگر در خصوص نقش احتمالی ژن *AT2G37050* در پاسخ به یون کادمیوم است (جدول ۱). خانواده گلوپتایون *S* ترانسفرازها یک آنزیم آنتی‌اکسیدانت بوده و نقش مهمی در سم‌زدایی و مقاومت گیاه به تنش‌های زنده و غیر زنده از قبیل گرما، سرما، شوری و علف‌کش‌ها دارد. افزایش بیان ژن گلوپتایون *S* ترانسفراز *GST10* در گیاه آراییدوپسیس تالیانا موجب تولید گیاه تراریخته‌ای شد که نسبت به تنش‌های اکسیداتیو و شوری مقاوم بود (Dixon and Edwards 2010). هی و همکارانش نیز در گیاه برنج تحت تنش سمیت کادمیوم ۱۷ نوع ژن رمز کننده *GST10* را شناسایی نمودند (He et al. 2015). همچنین انتقال ژن *GST10* از قارچ تریکودرما به گیاه توتون موجب افزایش مقاومت گیاه تراریخته تنباکو به کادمیوم گردید (Dixit et al. 2011). مطالعه پرتئومیک برگ گیاه آراییدوپسیس که در معرض ۱۰ میلی مولار کادمیوم قرار گرفته بود، نشان داد که میزان پروتئین‌های *HOP2* و *FSD1* به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (Semane et al. 2010). همچنین افزایش بیان ژن *FSD1* در شرایط تنش همزمان کادمیوم و اورانیوم در ریشه آراییدوپسیس تالیانا به اثبات رسیده است (Smeets et al. 2009; Vanhoudt et al. 2010). نمودار درختی فرآیند های زیستی غنی شده مرتبط با ۱۵۰ پروتئین ناپدید شده به‌دنبال از کار انداختن (knockout) ژن *AT2G37050* (شکل ۳) نشان داد که بالاترین میزان غنی‌شدگی که با رنگ قرمز نمایش داده شده است در ارتباط با فرآیند زیستی پاسخ به یون کادمیوم می‌باشد. اعداد این مربع این مفهوم را می‌رساند که در کل ژنوم آراییدوپسیس تالیانا ۴۷۰ ژن یا پروتئین مرتبط با پاسخ به یون کادمیوم وجود دارد در حالیکه از مجموعه ۱۵۰ پروتئین ناپدید شده ۲۰ پروتئین مرتبط با پاسخ به یون کادمیوم در این مجموعه قرار گرفته است. این اعداد بیانگر میزان غنی‌شدگی ۸ برابری در مجموعه ۱۵۰ پروتئینی نسبت به کل پروتئین‌های آراییدوپسیس تالیانا است. میزان غنی‌شدگی را میتوان از فرمول زیر محاسبه نمود.

$$\text{میزان غنی شدگی} = \frac{\frac{\text{تعداد پروتئین‌های مرتبط با در کادمیوم مجموعه}}{\text{کل پروتئین‌های موجود در مجموعه}}}{\frac{\text{تعداد پروتئین‌های مرتبط با کادمیوم در ژنوم آراییدوپسیس تالیانا}}{\text{کل پروتئین‌های موجود در ژنوم آراییدوپسیس تالیانا}}} = \frac{\frac{20}{470}}{\frac{150}{28397}} \approx 8$$

نتایج غنی‌شدگی با الگوریتم *agriGO*، علاوه بر تایید نتایج الگوریتم *GeneMANIA*، جزئیات بیشتری را ارائه می‌دهد. شکل ۵ میزان غنی‌شدگی در سطح بخش‌بندی سلولی را نشان می‌دهد. در این نمودار درختی، میزان غنی‌شدگی پروتئین‌ها در غشاء سیتوپلاسمی، غشاء واکوئل، پلاسمودسماتا و کلروپلاست جلب توجه می‌کند.

جدول ۲. لیست ۲۲ ژن دخیل در فرآیند زیستی "پاسخ به یون کادمیوم; GO: 0046686" به دنبال از کار افتادگی ژن *AT2G37050* در گیاه *Arabidopsis thaliana*

Table 2. List of involved genes in "response to cadmium ion, GO: 0046686" among 150 proteins which disappeared after knocking out *AT2G37050* gene in *Arabidopsis thaliana*.

جایگاه ژنی Locus	نام ژن Gene name	محل قرارگیری پروتئین در سلول cellular component	اقتباس شده از Originated from
AT5G42740	PGIC	سیتوزول، سیتوپلاسم	GeneMANIA
AT5G02790	GSTL3	سیتوزول، سیتوپلاسم، غشا پلاسمایی	GeneMANIA
AT3G13235	DDI1	سیتوزول، سیتوپلاسم، هسته	GeneMANIA
AT5G56680	SYNC1	سیتوزول، سیتوپلاسم، کلروپلاست، میتوکندری	GeneMANIA
AT1G45145	ATTRX5	سیتوپلاسم، سیتوزول، آپوپلاست، غشاء پلاسمایی، پلاسموسماتا	GeneMANIA
AT1G56450	PBG1	سیتوپلاسم، سیتوزول، ریبوزوم سیتوزولی، هسته، کمپلکس مرکزی پروتئازوم	GeneMANIA
AT3G27430	PBB1	سیتوزول، هسته، کمپلکس مرکزی پروتئازوم	agriGO
AT5G20830	SUS1	سیتوزول، پلاسموسماتا	GeneMANIA
AT5G12140	CYS1	سیتوزول، شبکه آندوپلاسمی، منطقه خارج سلولی، غشاء پلاسمایی، غشاء واکوئل	agriGO
AT2G32080	PUR ALPHA-1	سیتوپلاسم، هسته، پراکسیزوم	agriGO
AT1G62740	Hop2	سیتوپلاسم، هسته، سیتوزول، غشاء پلاسمایی	GeneMANIA
AT2G23350	PAB4	سیتوپلاسم، هسته، سیتوزول، کمپلکس ریبونوکلئوپروتئین، واکوئل	GeneMANIA
AT3G25230	ROF1	سیتوپلاسم، هسته، سیتوزول، پیرامون سلول	GeneMANIA
AT2G30110	ATUBA1	سیتوپلاسم، هسته، سیتوزول، غشاء پلاسمایی، پلاسموسماتا	GeneMANIA
AT3G14990	DJ1A	سیتوزول، غشاء پلاسمایی، پلاسموسماتا، واکوئل، غشاء واکوئل، کلروپلاست	GeneMANIA
AT1G11910	APA1	پلاسموسماتا، واکوئل، سیتوزول، منطقه خارج سلول	agriGO
AT1G11860	GDCST	آپوپلاست، کلروپلاست، غشاء کلروپلاست، استروما کلروپلاست، تیلاکوئید کلروپلاست، ریبوزوم سیتوزولی، غشاء، میتوکندری	GeneMANIA
AT4G32150	VAMP711	غشاء، غشاء واکوئل، غشاء پلاسمایی، کمپلکس SNARE	agriGO
AT1G13060	PBE1	سیتوپلاسم، هسته، کمپلکس مرکزی پروتئازوم	agriGO
AT4G25100	FSD1	کلروپلاست، غشاء کلروپلاست، نوکلئوئید کلروپلاست، استرومای کلروپلاست، سیتوپلاسم، میتوکندری، غشاء پلاسمایی، تیلاکوئید	GeneMANIA
AT2G28190	SOD2= CSD2	آپوپلاست، کلروپلاست، غشاء کلروپلاست، استروما کلروپلاست، سیتوپلاسم، تیلاکوئید، فضای بین سلولی	(Smeets et al. 2008).
AT5G65620	<i>TOP1</i>	کلروپلاست، استروما کلروپلاست، سیتوزول، میتوکندری، ماتریکس میتوکندری	(Polge et al. 2009)

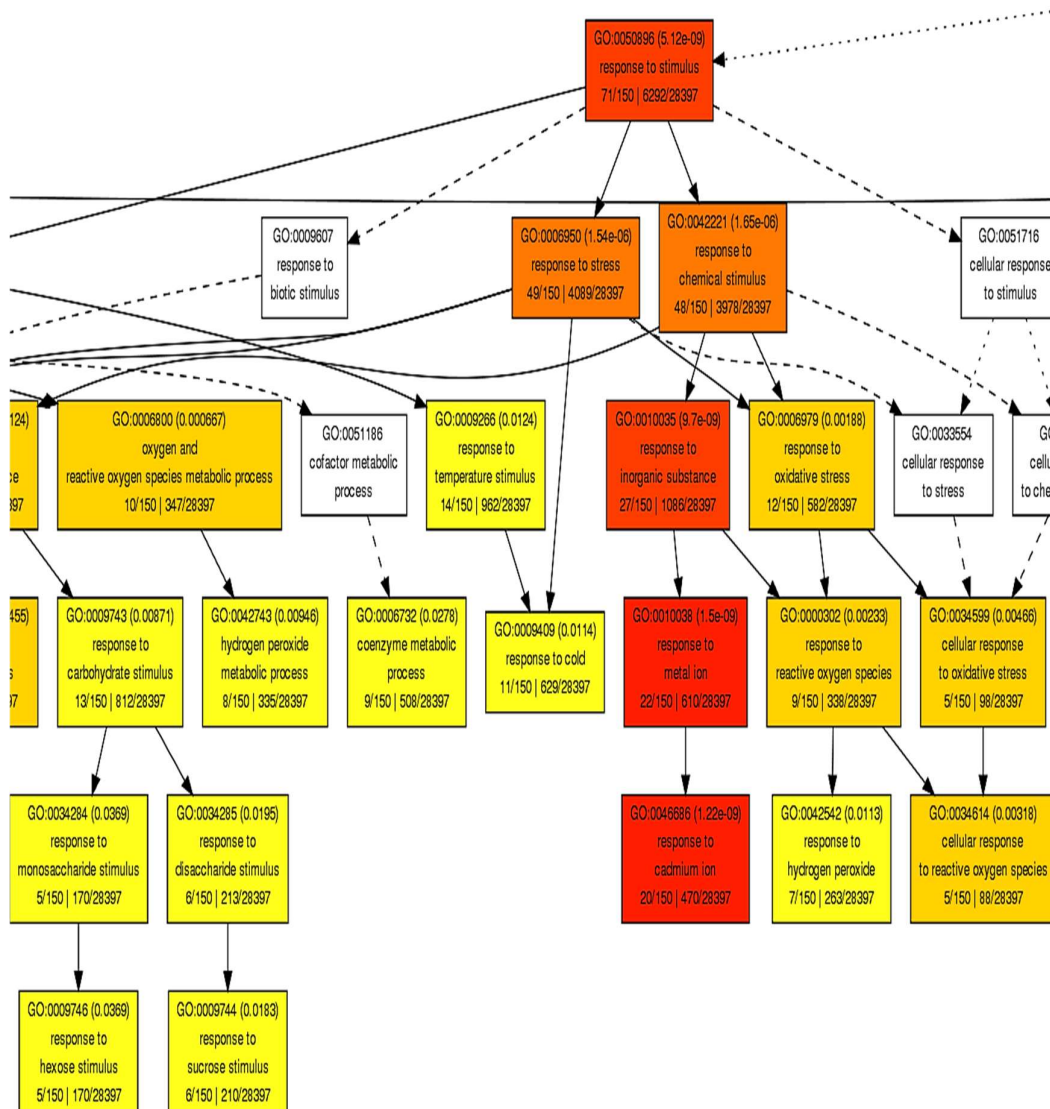
انتقال کادمیوم در ریشه، ساقه و برگ از طریق مسیرهای سیمپلاستیک و آپوپلاستیک که یکی از مکانیسم‌های دفاعی گیاه در مقابل تنش کادمیوم است انجام می‌پذیرد (Song et al. 2017). در مسیر آپوپلاستیک، انتقال محلول از طریق مایع خارج سلولی، فضای بین سلول‌ها و داخل دیواره سلولی انجام می‌پذیرد. در مسیر سیمپلاستیک، آب و محلول‌ها به‌صورت درون سلولی و از طریق انتقال سلول به سلول و کانال‌هایی که پلاسمودسماتا نامیده می‌شوند انتقال می‌یابد (Song et al. 2017). حضور پروتئین‌های *ATUBA1*, *APA1*, *SUS1*, *ATTRX5* و *Dj1A* در پلاسمودسماتا که در جدول ۱ نشان داده شده است مدرک تقویت کننده دیگری در تایید نقش احتمالی ژن *AT2G37050* در پاسخ به یون کادمیوم است. همچنین غنی‌شدگی GO term های انتقال یون از طریق غشاء، تنظیم انتقال یون و انتقال پروتئین در فایل تکمیلی SF2 قابل مشاهده است. نقش سمی کادمیوم در جوانه زنی گیاه خیار و تخریب غشاء واکوئل به اثبات رسیده است (Zhang et al. 2003). گیاه گوجه فرنگی^{۲۹} از طریق اتصال کادمیوم به دیواره سلولی و همچنین انتقال کادمیوم به درون واکوئل به وسیله ترانسپورترهای^{۳۰} موجود در غشاء واکوئل، از میزان سمیت این فلز سنگین می‌کاهد (Hasan et al. 2015). مطالعه پروتئومیک در گیاه جو که تحت تیمار با کادمیوم قرار گرفته بود، افزایش میزان دو پروتئین *CAX1a* ترانسپورتر و همچنین نوعی *ABC* ترانسپورتر همولوگ با *AtMRP3* را در غشاء واکوئل به اثبات رسانده است (Schneider et al. 2009). حضور پروتئین‌های *DJ1A*, *CYS1*, *VAMP711* و *APA1* در غشاء واکوئل در راستای نقش احتمالی ژن *AT2G37050* در "پاسخ به یون کادمیوم اهمیت دارد (جدول ۱). همچنین میزان پروتئین *CYS1* در استرس‌های غیر زنده دیگر شامل تنش حرارتی و زخمی کردن مکانیکی گیاه افزایش می‌یابد. این پروتئین در بافت آوندی اندام‌های گیاهی بیشتر بیان می‌شود (Hwang et al. 2010). این موضوع ممکن است با انتقال یون کادمیوم از طریق مسیرهای سیمپلاستیک و آپوپلاستیک مرتبط باشد. در پژوهشی Parmar et al. (2013) تغییرات ساختاری کلروپلاست، رنگدانه‌ها و کمپلکس پروتئین-کلروپلاست را در شرایط تنش کادمیوم گردآوری نموده‌اند. تیمار گیاه گندم با غلظت‌های بالایی از کادمیوم، منجر به صدمات ساختاری، تغییر شکل در کلروپلاست و اتساع غشاء تیلاکوئید شده است (Ouzounidou et al. 1997). همچنین شکستگی گرانای، گستردگی و افزایش غیر عادی فضای تیلاکوئید در گیاه سویا تحت تیمار با کادمیوم گزارش شده است (Ghoshroy and Nadakavukaren 1990). وجود GO term های "منطقه خارج سلولی"، "پلاسمودسماتا"، "غشاء واکوئل" و "کلروپلاست" در ارتباط با پروتئین *AT2G37050* می‌تواند دلیل تقویت کننده دیگری در خصوص ارتباط این ژن در "پاسخ به یون کادمیوم" باشد (شکل ۵).

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق علاوه بر پیشنهاد ژن جدید مؤثر در پاسخ به تنش کادمیوم می‌تواند در ساخت گیاهان

تراریخته تصفیه کننده خاک از آلودگی کادمیوم مورد توجه قرار گیرد.

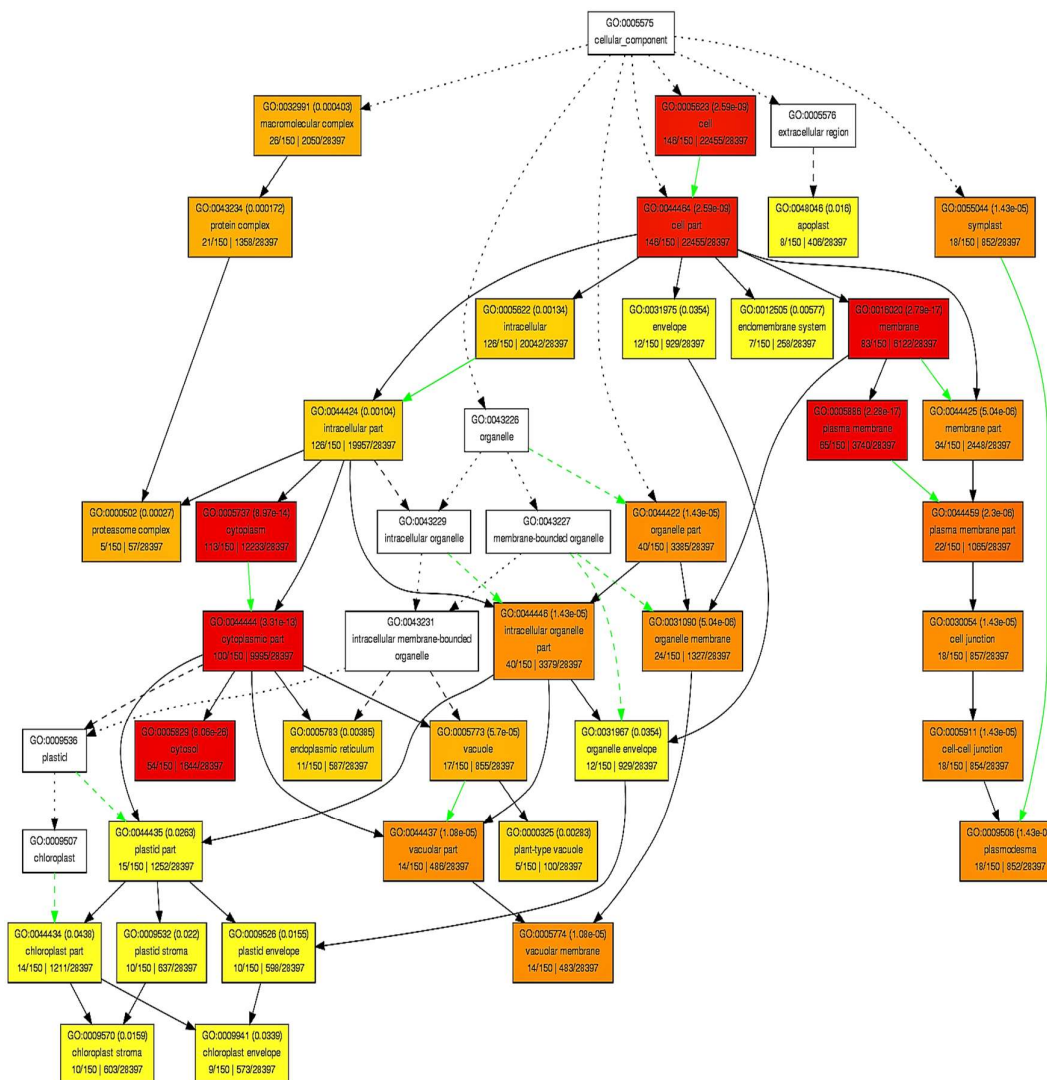
²⁹ *Solanum lycopersicum*

³⁰ Transporter



شکل ۳. نمودار درختی فرآیندهای زیستی غنی شده مرتبط با ۱۵۰ پروتئین ناپدید شده به دنبال از کار انداختن ژن *AT2G37050*. این شکل با الگوریتم *agriGO* و با روش *SEA* ترسیم شده است. در هر مربع فرآیند زیستی به همراه کد *GO term* و اطلاعات آماری قید شده است. *GO term* معنی دار ($P \leq 0.05$) با رنگ نمایش داده شده است و مربع‌های سفید رنگ *GO term* که از لحاظ آماری بی معنی است را نشان می‌دهد. شدت رنگ هر مربع با درجه غنی‌شدگی فریند زیستی ارتباط مستقیم دارد. تصویر کامل این نمودار درختی در شکل تکمیلی *SF1* نمایش داده شده است.

Figure 3. Hierarchical diagram result of enriched biological process related to 150 disappeared proteins after knockout of *AT2G37050* gene. The image has been illustrated by the *agriGO* algorithm and the *SEA* method. The significant *GO term* ($P \leq 0.05$) has been shown in color, and the white squares represent the *GO term* which is not statistically significant. The color intensity of each square is directly related to the degree of enrichment of the biological process. The complete image of this hierarchical diagram is shown in supplementary figure *SF1*.



شکل ۴. نمودار درختی غنی‌شدگی در سطح بخش بندی سلولی، مرتبط با ۱۵۰ پروتئین ناپدید شده به دنبال از کار انداختن ژن *AT2G37050*. این شکل با الگوریتم *agriGO* و با روش *SEA* ترسیم شده است. در هر مربع فرآیند زیستی به همراه کد *GO term* و اطلاعات آماری قید شده است. *GO term* معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بصورت رنگی نمایش داده شده است و مربع‌های سفید رنگ *GO term* که از لحاظ آماری بی معنی است را نشان می‌دهد. شدت رنگ هر مربع با درجه غنی‌شدگی فرآیند زیستی ارتباط مستقیم دارد.

Figure 4. Hierarchical diagram result of enriched cellular component related to 150 disappeared proteins after knockout of *AT2G37050* gene. The image has been illustrated by the *agriGO* algorithm and the *SEA* method. The significant *GO term* ($P \leq 0.05$) has been shown in color, and the white squares represent the *GO term* which is not statistically significant. The color intensity of each square is directly related to the degree of enrichment of the cellular component.

منابع

جزایری امید، آقاجانزاده طاهره‌السادت، الزنگا تنو (۱۳۹۶) مطالعه ارتباط ژن *TSAl* با مسیر بیوستنز گلوکوزینولات‌ها "ترکیبات ثانویه سولفوردار خانواده کلم". زیست فناوری گیاهان زراعی ۷(۲۰)، ۲۹-۴۰.

References

- Bahmani R, Kim D, Lee BD, Hwang S (2017) Over-expression of tobacco UBC1 encoding a ubiquitin-conjugating enzyme increases cadmium tolerance by activating the 20S/26S proteasome and by decreasing Cd accumulation and oxidative stress in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Plant Mol Biol* 94, 433–451.
- Bertin G, Averbeck D (2006) Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 88, 1549–1559.
- DalCorso G, Farinati S, Furini A (2010) Regulatory networks of cadmium stress in plants. *Plant signal behav* 5, 663–667.
- Dametto A, Buffon G, Reis Blasi ÉA dos, Sperotto RA (2015) Ubiquitination pathway as a target to develop abiotic stress tolerance in rice. *Plant signal behav* 10, e1057369.
- Dixit P, Mukherjee PK, Ramachandran V, Eapen S (2011) Glutathione transferase from *Trichoderma virens* enhances cadmium tolerance without enhancing its accumulation in transgenic *Nicotiana tabacum*. *PLoS One* 6, e16360.
- Dixon DP, Edwards R (2010) Glutathione Transferases. *The Arabidopsis Book*. In: *The Case of Glutathione S-Transferases (GSTs). Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants*, Springer, pp.173–202.
- Djebali W, Gallusci P, Polge C et al. (2008) Modifications in endopeptidase and 20S proteasome expression and activities in cadmium treated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Planta* 227, 625–639.
- Du Z, Zhou X, Ling Y et al. (2010) agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Res* 38, W64-W70.
- Ghoshroy S, Nadakavukaren MJ (1990) Influence of cadmium on the ultrastructure of developing chloroplasts in soybean and corn. *Environ Exp Bot* 30, 187–192.
- Hasan M, Ahammed GJ, Yin L et al. (2015) Melatonin mitigates cadmium phytotoxicity through modulation of phytochelatins biosynthesis, vacuolar sequestration, and antioxidant potential in *Solanum lycopersicum* L. *Front Plant Sci* 6, 601.
- He F, Liu Q, Zheng L et al. (2015) RNA-Seq analysis of rice roots reveals the involvement of post-transcriptional regulation in response to cadmium stress. *Front Plant Sci* 6, 1136.

- Heidari P, Ahmadizadeh M, Izanlo F, Nussbaumer T (2019) In silico study of the CESA and CSL gene family in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*: Focus on post-translation modifications. *Plant Gene* 19, 100189.
- Hwang JE, Hong JK, Lim CJ et al. (2010) Distinct expression patterns of two *Arabidopsis* phytoalexin genes, AtCYS1 and AtCYS2, during development and abiotic stresses. *Plant Cell Rep* 29, 905–915.
- Jazayeri O, Aghajanzadeh T, Eleznga T (2017) Relation between TSA1 gene and biosynthesis of glucosinolates” secondary sulfur compounds in Brassicaceae family”. *Crop Biotech* 7, 29–40.
- Kurepa J, Smalle JA (2008) Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie* 90, 324–335.
- Liu J, Gao Y, Tang Y et al. (2019) Genome-Wide Identification, Comprehensive Gene Feature, Evolution and Expression Analysis of Plant Metal Tolerance Proteins in Tobacco Under Heavy Metal Toxicity. *Front genet* 10, 345.
- Manzano C, Abraham Z, López-Torrejón G, Pozo JC (2008) Identification of ubiquitinated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 68, 145–58.
- Marmioli M, Imperiale D, Maestri E, Marmioli N (2013) The response of *Populus* spp. to cadmium stress: chemical, morphological and proteomics study. *Chemosphere* 93, 1333–44.
- Meiri D, Tazat K, Cohen-Peer R, Farchi-Pisanty O et al. (2010) Involvement of *Arabidopsis* ROF2 (FKBP65) in thermotolerance. *Plant Mol Biol* 72, 191–203.
- Niu C, Jiang M, Li N et al. (2019) Integrated bioinformatics analysis of As, Au, Cd, Pb and Cu heavy metal responsive marker genes through *Arabidopsis thaliana* GEO datasets. *PeerJ* 7, e6495.
- Ouzounidou G, Moustakas M, Eleftheriou E (1997) Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Arch Environ Con Tox* 32, 154–160.
- Park HC, Choi W, Park HJ et al. (2011) Identification and molecular properties of SUMO-binding proteins in *Arabidopsis*. *Mol Cells* 32, 143–51.
- Parmar P, Kumari N, Sharma V (2013) Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. *Botanical Stud* 54, 45.
- Pena LB, Pasquini LA, Tomaro ML, Gallego SM (2007) 20S proteasome and accumulation of oxidized and ubiquitinated proteins in maize leaves subjected to cadmium stress. *Phytochemistry* 68, 1139–46.

- Polge C, Jaquinod M, Holzer F et al. (2009) Evidence for the Existence in *Arabidopsis thaliana* of the Proteasome Proteolytic Pathway: activation in response to cadmium. *J Biol Chem* 284, 35412–24.
- Provart NJ, Alonso J, Assmann SM et al. (2016) 50 years of *Arabidopsis* research: highlights and future directions. *New Phytologist* 209, 921–944.
- Redondo-Gómez S, Mateos-Naranjo E, Andrades-Moreno L (2010) Accumulation and tolerance characteristics of cadmium in a halophytic Cd-hyperaccumulator, *Arthrocnemum macrostachyum*. *J Hazard Mater* 184, 299–307.
- Saito R, Smoot ME, Ono K et al. (2012) A travel guide to Cytoscape plugins. *Nat Methods* 9, 1069–1076.
- Sarry J-E, Kuhn L, Ducruix C et al. (2006) The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics* 6, 2180–2198.
- Schneider T, Schellenberg M, Meyer S et al. (2009) Quantitative detection of changes in the leaf-mesophyll tonoplast proteome in dependency of a cadmium exposure of barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. *Proteomics* 9, 2668–2677.
- Semane B, Dupae J, Cuypers A et al. (2010) Leaf proteome responses of *Arabidopsis thaliana* exposed to mild cadmium stress. *J Plant Physiol* 167, 247–54.
- Smeets K, Opdenakker K, Remans T et al. (2009) Oxidative stress-related responses at transcriptional and enzymatic levels after exposure to Cd or Cu in a multipollution context. *J Plant Physiol* 166, 1982–1992.
- Smeets K, Ruytinx J, Semane B et al. (2008) Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. *Environ Exp Bot* 63, 1–8.
- Song Y, Jin L, Wang X (2017) Cadmium absorption and transportation pathways in plants. *Int J Phytoremediation* 19, 133–141.
- Stone SL (2019) Role of the ubiquitin proteasome system in plant response to abiotic stress. *Int Rev Cell Mol Biol* 343, 65–110.
- Toppi LS Di, Gabbrielli R (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot* 41, 105–130.
- Vanhoudt N, Vandenhove H, Horemans N et al. (2010) Study of oxidative stress related responses induced in *Arabidopsis thaliana* following mixed exposure to uranium and cadmium. *Plant Physiol Biochem* 48, 879–886.
- Wan X, Mo A, Liu S et al. (2011) Constitutive expression of a peanut ubiquitin-conjugating enzyme gene in *Arabidopsis* confers improved water-stress tolerance through regulation of stress-responsive gene expression. *J Biosci Bioeng* 111, 478–484.

- Wang Q, Geng T, Zhu S et al. (2017) Analysis of miRNA-seq combined with gene expression profile reveals the complexity of salinity stress response in *Oryza sativa*. *Acta Physiol Plant* 39, 272.
- Yadav BS, Mani A (2019) Analysis of bHLH coding genes of *Cicer arietinum* during heavy metal stress using biological network. *Physiol Mol Biol Plants* 25, 113–121.
- Yu J, Zhang Y, Liu J et al. (2018) Proteomic discovery of H₂O₂ response in roots and functional characterization of PutGLP gene from alkaligrass. *Planta* 248, 1079–1099.
- Zhai Z, Gayomba SR, Jung H et al. (2014) OPT3 is a phloem-specific iron transporter that is essential for systemic iron signaling and redistribution of iron and cadmium in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26, 2249–2264.
- Zhang F, Shi W, Jin Z, Shen Z (2003) Response of antioxidative enzymes in cucumber chloroplasts to cadmium toxicity. *J Plant Nutr* 26, 1779–1788.
- Zhou Q, Yang Y, Yang Z (2019) Molecular dissection of cadmium-responsive transcriptome profile in a low-cadmium-accumulating cultivar of *Brassica parachinensis*. *Ecotox Environ Safe* 176, 85–94.
- Zuberi K, Franz M, Rodriguez H et al. (2013) GeneMANIA prediction server 2013 update. *Nucleic Acids Res* 41, W115–W122.