University of Birjand

Journal homepage:
https://escs.birjand.ac.ir

تنشهای محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses In Crop Sciences

Vol. 16, No. 3, pp. 603-612 (Fall 2023)

https://dx.doi.org/10.22077/escs.2023.4829.2078

Original article

Gene expression study of signaling pathway in response to high salinity stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings

M. Akbarzadeh Lelekami[1], M.H. Pahlevani[2*], Kh. Zaynali Nezhad[3], K. Mahdavi Mashaki[4], A. P.M. Weber[5], D. Brilhaus[6]

1. Former PhD student, Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Associate Professor of Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3. Assistant Professor of Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
4. Assistant Professor, Rice Research Institute of Iran, Mazandaran Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Amol, Iran
5. Professor of Plant Biochemistry Department, Heinrich Heine University (HHU), Düsseldorf, Germany
6. Assistant Professor of Plant Biochemistry Department, Heinrich Heine University (HHU), Düsseldorf, Germany

Received 1 November 2021; Accepted 8 January 2022

Extended abstract

Introduction

Salinity as one of the major abiotic stresses influences plant growth and development. Among the cereal, rice is the most sensitive to salinity stress, with 30 mmol NaCl already strongly reducing the growth and yield of rice plants. Over the past few decades, significant efforts have been made worldwide to understand mechanisms of salinity tolerance and to breed salt-tolerant varieties in rice. Plants respond to salt stress through perceiving and transducing the osmotic and ion signals to cell interiors, followed by modification of cellular characteristics.

So far, no specific sensor or receptor for Na+ has been identified in plants. However, the salt overly sensitive (SOS) signaling pathway and calcineurin B-like (CBL)/CBL-interacting kinase (CIPK) pathway has been well characterized in Arabidopsis. Salt-induced elevation in cytosolic Ca2+ activates the SOS2-SOS3 protein kinase complex, which phosphorylates and stimulates the activity of SOS1, a plasma membrane Na+/H+ antiporter. In rice, the OsSOS1, OsSOS2/OsCIPK24 and OsSOS3/OsCBL4 genes have been isolated and the function and relationship between them investigated. Among them, OsCIPK24 and OsCBL4 act in concert to activate OsSOS1. In this research, we used RNA-seq approach to dissect signaling pathway in response to salinity stress using salt-tolerant and sensitive rice cultivars.

Materials and methods

The seeds of two rice (*Oryza sativa* L. ssp. Indica) genotypes with different salinity tolerance were obtained from International Rice Research Institute (IRRI) in Philippines. The plants were grown hydroponically in the greenhouse of Heinrich-Heine-University (HHU), Düsseldorf, Germany. The two-week old seedlings were exposed to 150 mM (15 dSm^{-1}) NaCl salinity. The root and shoot samples were harvested at 6h and 54h post-treatment in three biological replications. 48 samples were sequenced by Illumina platform and the raw filtered reads were mapped on rice reference genome. Tuxedo instruction

*Corresponding author: Mohammad Hadi Pahlevani; E-Mail: hpahlavani@yahoo.com

© 2023, The Author(s). Published by University of Birjand. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0).

was applied to identifying the differentially expressed genes (DEGs). MapMan software was used to identify the genes involved in signaling pathway

Results and discussion

In RNA-Seq analysis, 48 samples were sequenced by Illumina platform and 15483 differentially expressed genes (DEGs) were identified. Out of the DEGs (from the comparison between the cultivars), 525 and 1472 genes were salt-specific in 6 and 54h time points in roots respectively. Out of the salt-specific DEGs in shoots, 635 and 606 genes were in 6 and 54h respectively. MapMan pathway analysis detected 91 genes in signaling pathway. Out of the genes, 27 genes showed high expression. Out of the genes, 21 genes showed more expression in tolerant cultivar CSR28 compared to sensitive cultivar IR28. The most difference between the cultivars was observed in roots after 54h of salt treatment suggesting the critical role of roots in salt tolerance induction. Receptor like kinase (RLK) proteins played the most important role among the identified signaling genes. Several important genes involved in major signaling processes such as OsSIK1, OsSAPK4, OsCIPK05, OsCIPK14, OsCBL4 and OsPP2C1 were identified in this research.

Conclusion

Salt-tolerant cultivars use better signaling pathways to sensing of stress and having the stronger osmotic and ionic reactions to cope with salinity stress. In the present research, huge number of differentially expressed genes generated using rice tolerant cultivar CSR28 and sensitive cultivar IR28 at 6 and 54h sampling times by RNA-Seq method. The comparison of the cultivars at specific salt stress showed that 91 genes (including 27 high expressed genes) were involved in signaling pathway. Kinase proteins played the most important role among the signaling pathway genes. The important genes identified in this research can be applied in the selecting and developing of salt-tolerant rice cultivars.

Acknowledgements

We appreciate the International Rice Research Institute (IRRI) for providing the seeds. We also acknowledge the excellent technical assistance of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GAU), Gorgan, Iran and Heinrich-Heine-University (HHU), Düsseldorf, Germany.

***Keywords*:** Hydroponic, Kinase proteins, MapMan, Signaling pathway, Transcriptome

تنشهای محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد شانزدهم، شماره سوم، پائیز ۱۴۰۲

https://dx.doi.org/10.22077/escs.2023.4829.2078

مقاله پژوهشی

مطالعه بیان ژن‌های مسیر پیام‌رسانی در واکنش به تنش شوری بالا در گیاهچه‌های برنج (*Oryza sativa* L.)

مژده اکبرزاده للکامی[۱]، محمدهادی پهلوانی[۲*]، خلیل زینلی‌نژاد[۳]، کیوان مهدوی ماشکی[۴]، آندریاس پی.ام وبر[۵]، دومینیک بریل‌هاوس[۶]

۱. دانشجوی سابق دکتری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
۲. دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
۳. استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
۴. استادیار پژوهش موسسه تحقیقات برنج کشور، معاونت مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، آمل
۵. استاد گروه بیوشیمی گیاهی، دانشگاه HHU، دوسلدورف، آلمان
۶. استادیار گروه بیوشیمی گیاهی، دانشگاه HHU، دوسلدورف، آلمان

مشخصات مقاله

واژه‌های کلیدی:
پروتئین‌های کینازی
ترانسکریپتوم
مسیر پیام‌رسانی
هیدروپونیک
MapMan

تاریخ دریافت:
۱۴۰۰/۰۸/۱۰

تاریخ پذیرش:
۱۴۰۰/۱۰/۱۸

تاریخ انتشار:
پائیز ۱۴۰۲
۱۶(۳): ۶۰۳-۶۱۲

چکیده

به دلیل حساسیت بالا، رشد و نمو و عملکرد گیاه برنج تحت تأثیر تنش شوری به‌شدت کاهش می‌یابد. درک وقوع تنش و اتخاذ واکنش‌های اسمزی و یونی نیازمند درگیرکردن مسیرهای پیام‌رسانی است. در تحقیق حاضر یک مطالعه RNA-Seq به‌منظور مطالعه بیان ژن‌های درگیر در مسیر پیام‌رسانی تنش شوری در برنج صورت پذیرفت. بدین منظور ارقام حساس IR28 و متحمل CSR28 پس از جوانه‌زنی و کشت در محیط کشت هیدروپونیک، تحت تیمار شوری ۱۵۰ میلی‌مولار قرار گرفتند و پس از ۶ و ۵۴ ساعت از وقوع تنش، نمونه‌برداری از اندام‌های ریشه و هوایی انجام شد. از ۴۸ نمونه توالی‌یابی شده درمجموع ۱۵۴۸۳ ژن دارای بیان افتراقی بودند که تجزیه مسیر MapMan توانست ۹۱ ژن درگیر در مسیر پیام‌رسانی را با مقایسه ارقام حساس و متحمل در شرایط اختصاصی تنش شوری شناسایی کند که ۲۷ ژن دارای بیان بالا بودند. بیشترین اختلاف ارقام مربوط به زمان ۵۴ ساعت و اندام ریشه بود که در ۲۱ ژن رقم متحمل بیان بالاتری نسبت به رقم حساس داشت. بررسی نوع ژن‌های پیام‌رسان نشان داد که پروتئین‌های کینازی بیشترین سهم را داشتند. ژن‌های OsSIK1، OsSAPK4، OsCIPK05، OsCIPK14، OsCBL4 و OsPP2C1 از مهم‌ترین ژن‌های درگیر در پیام‌رسانی بودند که در تحقیق حاضر بیان بالاتری در رقم متحمل CSR28 نسبت به رقم حساس IR28 داشتند. شناسایی ژن‌های درگیر در مسیرهای پیام‌رسانی و آگاهی از نحوه تعامل آن‌ها، کمک شایانی به اصلاحگران به‌منظور انتخاب و توسعه ارقام برنج متحمل به تنش شوری خواهد کرد.

مقدمه

امروزه کشاورزی با نگرانی عمیق جهت تأمین امنیت غذایی جمعیت رو به افزایش کره زمین مواجه است. جمعیت دنیا تا سال ۲۰۵۰ به بیش از ۹ میلیارد نفر خواهد رسید که برای برآورده کردن نیاز غذایی آن‌ها لازم است تولید محصولات زراعی به بیش از دو برابر افزایش یابد. بخش بزرگی از این جمعیت (بیش از ۶۰ درصد) وابسته به برنج به‌عنوان غذای اصلی هستند (Hunter et al., 2017).

برنج در طیف متنوعی از محیط‌ها با آب‌وهوا و شرایط آبی و خاکی مختلف تولید می‌شود. بااین‌حال، شرایط نامساعد محیطی رشد و نمو برنج را به‌شدت تهدید می‌کند و باعث کاهش قابل‌توجه عملکرد در مناطق وسیعی از بخش‌های اصلی تولید می‌شود. تنش‌های زنده و غیرزنده هر دو غالباً از دستیابی به رشد و عملکرد مطلوب برنج جلوگیری می‌کنند. این تنش‌ها شامل شوری، کم‌آبی، گرما و سرما هستند که

* نگارنده پاسخگو: محمدهادی پهلوانی. پست الکترونیک: hpahlavani@yahoo.com

تأثیر منفی بر عملکرد و تولید رویشی برنج می‌گذارند و یک خطر اساسی برای ایمنی مواد غذایی در سراسر جهان محسوب می‌شوند (Mantri et al., 2012). از بین عوامل تنش‌زای محیطی مختلف، شوری از عوامل اصلی است که تولید محصول را تهدید می‌کند. برنج در مرحله گیاهچه‌ای به‌عنوان غله حساس به شوری گروه‌بندی شده است و همچنین در اثر شوری کارایی تولید آن در مرحله زایشی محدود می‌شود (Todaka et al., 2012). به‌منظور افزایش عملکرد دانه برنج تحت تنش شوری، لازم است ابتدا مکانیسم-های اساسی مولکولی تحمل به شوری را در این گیاه درک کنیم. تحمل نسبت به شوری یک صفت کمی در گیاهان است که توسط تعداد زیادی از ژن‌ها تنظیم می‌شود (Chinnusamy et al., 2005).

در گیاهان، پاسخ به شوری از طریق درک و انتقال پیام‌های اسمزی و یونی به درون سلول و سپس تغییرات در ویژگی‌های سلولی صورت می‌گیرد. تاکنون حس‌گر یا دریافت‌کننده پیام اختصاصی برای یون سدیم در گیاهان شناسایی نشده است (Nongpiur et al., 2020)، اما مسیر پیام‌رسانی SOS و مسیرهای CBL[1] و CIPK[2] به‌خوبی در آرابیدوپسیس مشخص گردیده است. افزایش غلظت یون کلسیم در سیتوزول به‌واسطه وجود نمک، موجب فعال‌سازی کمپلکس پروتئین کینازی SOS2-SOS3[3] می‌شود که درنهایت از طریق فسفوریله کردن باعث فعال‌سازی آنتی‌پورتر غشایی SOS1 می‌شود که مهم‌ترین نقش را در خارج کردن یون‌های سمی سدیم از سلول بازی می‌کند (Qiu et al., 2002). در برنج ژن‌های OsSOS1، OsSOS2/OsCIPK24 و OsSOS3/OsCBL4 جداسازی شده و کارکرد و ارتباط آن‌ها موردمطالعه قرار گرفته است که از بین آن‌ها OsCIPK24 و OsCBL4 در فعال‌سازی OsSOS1 نقش دارند (Martinez-Atienza et al., 2007). علاوه بر CBLها و CIPKها، کینازهای وابسته به کلسیم (CDPK[4]) در تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی کلسیم نقش دارند. درمجموع ۲۹ CDPK در ژنوم برنج شناسایی شده است که برخی از آن‌ها در واکنش به تنش شوری نقش دارند. ژن OsCDPK7 به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت در تحمل به تنش‌های سرما، خشکی و شوری در برنج مؤثر است (Saijo et al., 2000). بیان بالای ژن OsCPK12 در کاهش تجمع پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و ROS[5]ها و در نتیجه افزایش تحمل به شوری برنج نقش دارد (Asano et al., 2012).

در تحقیق حاضر با استفاده از ارقام برنج متحمل و حساس به تنش شوری و به کمک روش RNA-Seq بیان ژن‌های مسیر پیام‌رسانی موردمطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تیمار شوری در شرایط کشت هیدروپونیک

در این تحقیق از بذور دو رقم برنج متحمل (CSR28) و حساس (IR28) به شوری که از مؤسسه بین‌المللی تحقیقات برنج در فیلیپین (IRRI, Philippines) تهیه شده بودند استفاده گردید. در گزارش پیشین توسط نویسندگان این مقاله، ارزیابی‌های متابولیکی نشان داد که ارقام CSR28 و IR28 دارای تفاوت فاحش در پاسخ به شوری هستند (Akbarzadeh et al., 2020). رشد گیاهان و اجرای آزمایش در گلخانه دانشگاه HHU[6] واقع در شهر دوسلدورف کشور آلمان صورت پذیرفت. بعد از ضدعفونی توسط هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد، بذور داخل پتریدیش در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی جوانه‌دار شدند. سپس جوانه‌ها به درون تشت‌های چهار لیتری حاوی محیط کشت یوشیدا (Yoshida et al., 1971) با pH ۵/۵ منتقل شدند و در شرایط نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی و دمای ۲±۲۸ درجه سلسیوس رشد کردند. محیط کشت هر سه روز تعویض شد و گیاهچه‌های دوهفته‌ای با اضافه شدن کلرید سدیم در معرض شوری ۱۵۰ میلی‌مولار ($15\ dSm^{-1}$) قرار گرفتند، درحالی‌که مقدار هدایت الکتریکی (EC[7]) برای گیاهان شاهد $1\ dSm^{-1}$ بود. نمونه‌گیری از ریشه و اندام هوایی در گیاهان کنترل و تحت تیمار شوری در زمان‌های ۶ ساعت و ۵۴ ساعت پس از اعمال شوری صورت پذیرفت و پس از قرارگیری در ازت مایع در فریزر منفی ۸۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

[1] Calcineurin B-like
[2] CBL-interacting kinase
[3] Salt overly sensitive
[4] Calcium-dependent protein kinases
[5] Reactive oxygen species
[6] Heinrich-Heine-University
[7] Electrical conductivity

استخراج RNA، ساخت کتابخانه RNA-Seq و توالی‌یابی ایلومینا

استخراج RNA توسط کیت RNeasy Plant Mini (Qiagen, Hilden, Germany) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. به‌منظور حذف آلودگی DNA، تیمار با آنزیم DNase1 صورت پذیرفت و درنهایت کیفیت RNA استخراجی با Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, USA) سنجیده شد و نمونه‌های دارای RNA یکنواخت (RIN[8] ≥ 8) جهت تهیه کتابخانه RNA-Seq انتخاب شدند. ساخت کتابخانه RNA-Seq با استفاده از کیت TruSeq RNA Sample Preparation (Illumina, San Diego, USA) انجام شد و کیفیت و اندازه قطعات cDNA توسط Bioanalyzer 2100 مورد ارزیابی قرار گرفت. درمجموع ۴۸ کتابخانه (دو رقم × دو تیمار × دو اندام × دو زمان نمونه‌برداری × سه تکرار بیولوژیک) توسط پلتفرم Illumina HiSeq 3000 و به‌صورت یک‌طرفه با قطعات ۱۵۰ جفت بازی (150 × 1) در آزمایشگاه ژنومیکس و ترانسکریپتومیکس BMFZ[9] واقع در دانشگاه HHU توالی‌یابی شدند. پس از کنترل کیفیت داده‌های خام توالی‌یابی توسط نرم‌افزار FastQC v0.11.7 (Andrews, 2010)، آداپتورها، آغازگرها و توالی‌های بی‌کیفیت توسط نرم‌افزار Trimmomatic v0.36 (Bolger et al., 2014) حذف شدند.

شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs) و تجزیه مسیر MapMan

از دستورالعمل Tuxedo (Trapnell et al., 2012) برای تجزیه‌وتحلیل بیان ژن استفاده شد. ابتدا خوانش‌های[10] فیلتر شده و با کیفیت روی توالی‌های ژنوم مرجع برنج IRGSP[11] v1.0 (https://plants.ensembl.org/info/data/ftp/index.html) با استفاده از TopHat v2.1.1 (Trapnell et al., 2009) نقشه‌یابی[12] شدند. از طریق نرم‌افزار Cufflinks v2.2.1 (Trapnell et al., 2010) گردآوری مبتنی بر آنوتیشن[13] مرجع برای توالی‌های نقشه‌یابی شده در همه نمونه‌ها صورت گرفت و سپس ترانسکریپتوم یکپارچه به کمک Cuffmerge به دست آمد. بیان ژن‌ها در تمامی نمونه‌ها از طریق محاسبه شاخص RPKM[14] نرمال‌سازی شد. ژن‌های افتراقی از طریق مقایسه بیان ژن‌ها در نمونه‌های مختلف توسط نرم‌افزار Cuffdiff (Trapnell et al., 2013) شناسایی شدند. ژن‌هایی که دارای log2 FC[15] ≥ 1.5 یا log2 FC ≤ -1.5 و سطح احتمال FDR[16] ≤ 0.05 (P-value تصحیح‌شده) بودند به‌عنوان ژن‌های افتراقی معنی‌دار لحاظ گردیدند.

برای تجزیه مسیر پیام‌رسانی، از ژن‌هایی که به‌صورت اختصاصی در شرایط تنش شوری بین دو رقم متحمل و حساس بیان افتراقی داشتند استفاده شد. تجزیه مسیر این ژن‌ها توسط نرم‌افزار MapMan v3.6.0 (http://mapman.gabipd.org/mapman-version-3.6.0) (Thimm et al., 2004) با P-value cut-off ≤ 0.05 انجام شد. به‌منظور نقشه‌یابی از ژن‌های مسیر گونه *Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. Nipponbare به‌عنوان مرجع استفاده شد. نتایج حاصل، از طریق ترسیم نقشه دمایی[17] برای ژن‌های افتراقی با بیان بالا (log10 FC ≥ 3 یا log10 FC ≤ -3) به کمک نرم‌افزار MeV v4.9.0[18] (Howe et al., 2011) به نمایش درآمد.

نتایج و بحث

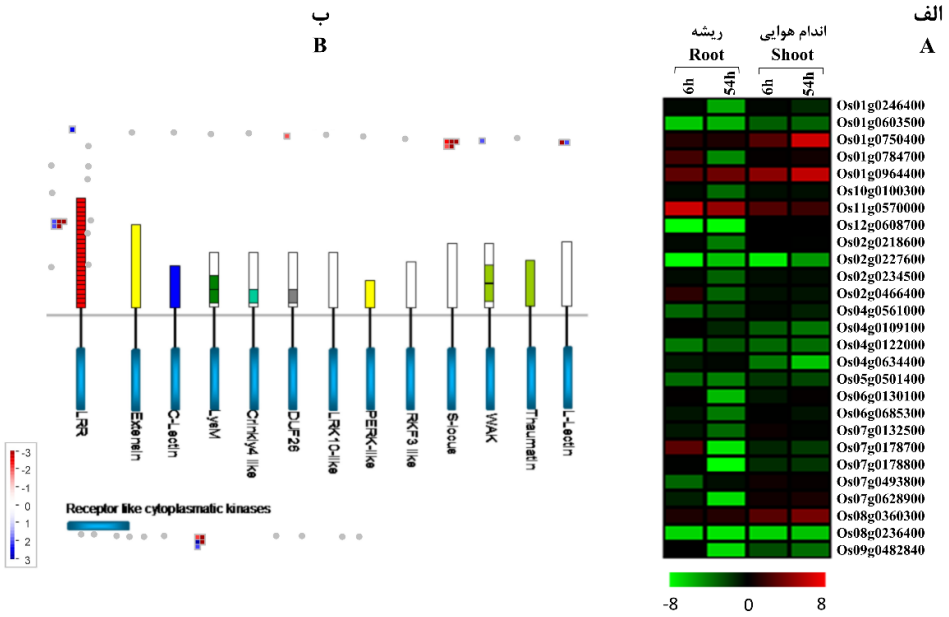
نتایج توالی‌یابی RNA-Seq

از مقایسه ۴۸ نمونه توالی‌یابی شده (شامل دو رقم، دو تیمار شوری، دو زمان نمونه‌برداری، دو اندام و سه تکرار بیولوژیک) درمجموع ۱۵۴۸۳ ژن با بیان افتراقی شناسایی شدند. همچنین از مقایسه دو رقم حساس و متحمل در شرایط اختصاصی تنش شوری، تعداد ۵۲۵، ۱۴۷۲، ۶۳۵ و ۶۰۶ ژن به ترتیب در زمان‌های ۶ و ۵۴ ساعت اندام ریشه و زمان‌های ۶ و ۵۴ ساعت اندام هوایی شناسایی شدند.

[8] RNA integrity number
[9] Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum
[10] Read
[11] International rice genome sequencing project
[12] Mapping
[13] Annotation-guided assembly
[14] Reads per kilobase of transcript per million mapped reads
[15] Fold change
[16] False discovery rate
[17] Heatmap
[18] Multiple experiment viewer

شناسایی ژن‌های مسیر پیام‌رسانی

تجزیه مسیر ژن‌های اختصاصی تنش شوری توسط MapMan، منجر به شناسایی ۹۱ ژن در مسیر پیام‌رسانی شد که از این تعداد ۲۷ ژن دارای بیان بالا ($\log2\ FC \geq 3$ یا $\log2\ FC \leq -3$) حداقل در یکی از زمان‌ها یا اندام‌های نمونه‌برداری بودند و نتایج بیان آن‌ها به شکل نقشه دمایی در شکل ۱-الف آمده است.



شکل ۱. (الف) نقشه دمایی برای مسیر پیام‌رسانی MapMan با استفاده از ژن‌های اختصاصی تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای. افزایش بیان در ارقام متحمل CSR28 و حساس IR28 (ژن‌های با بیان بالا به‌صورت $\log2\ fold\ change \geq 3$ یا $\log2\ fold\ change \leq -3$) به ترتیب با رنگ‌های سبز و قرمز نشان داده شده است، (ب) مقایسه ژن‌های افتراقی بین ارقام برنج متحمل CSR28 و حساس IR28 در شرایط اختصاصی تنش شوری در ارتباط با پروتئین‌های کینازی .MapMan مربع‌های قرمز (افزایش بیان در رقم متحمل)، مربع‌های آبی (افزایش بیان در رقم حساس)

Fig. 1. (A) Heatmap for MapMan signaling pathway using specific genes of sailinty stress at seedling stage. Overexpression (high expression of genes as log2 FC ≥ 3 or ≤ -3) in tolerant cultivar CSR28 and sensitive cultivar IR28 are represented by green and red colores, respectively. (B) MapMan kinase proteins by the comparison of differentially expressed genes between tolerant cultivar CSR28 and sensitive cultivar IR28 in specific condition of salinity stress. Red and blue squares indicate overexpression in tolerant and sensitive cultivars, respectively.

بیشترین اختلاف ارقام مربوط به زمان تیمار شوری ۵۴ ساعت در ریشه بود که در ۲۱ ژن رقم متحمل بیان بالاتری نسبت به رقم حساس داشت. در گزارش‌های متعدد از اندام ریشه به‌عنوان اولین و مهم‌ترین سد مقابله با تنش شوری یاد شده است که می‌توان در انطباق با این تحقیق، از ریشه به‌عنوان مهم‌ترین اندام در تفاوت تحمل به تنش شوری ارقام یاد کرد (Walia et al., 2007; Cotsaftis et al., 2011; Mansuri et al., 2019). برخی از ژن‌ها نظیر Os01g0603500، Os02g0227600، Os04g0122000، Os05g0501400 و Os08g0236400 به‌صورت اختصاصی در رقم متحمل در تمام شرایط افزایش بیان نسبت به رقم حساس داشتند. در بررسی این ژن‌های اختصاصی مشخص گردید که ژن cf2/cf5-like (Os01g0603500) به‌عنوان یک پروتئین مقاومت به بیماری نقش دارد (Nagy et al., 2007). ژن‌های Os02g0227600 و Os04g0122000 نیز با داشتن دمین غنی از لوسین به‌عنوان گیرنده در مقاومت به بیماری درگیر بودند (Wang et al., 2020; Jung et al., 2021). ژن SDRLK-4 (Os05g0501400) یکی از انواع پروتئین‌های کینازی است که به خانواده S-domainها تعلق دارد. ژن‌های این خانواده در بسیاری از مسیرهای پیام‌رسانی در فرایندهای بیولوژیکی نقش دارند (Naithani et al., 2021). دیگر ژن اختصاصی شناسایی شده در این تحقیق OsRLCK248 (Os08g0236400) بود که به‌عنوان یکی از کینازهای مهم در پیام‌رسانی تنش‌های غیرزیستی در برنج

معرفی شده بود (Vij et al., 2008). همچنین ژن Os12g0608700 به‌صورت اختصاصی اندام در هر دو زمان در ریشه رقم متحمل بیان بیشتری نشان داد. این ژن با نام Gnk2 به‌عنوان یک پروتئین ذخیره‌ای در دانه عمل می‌کند و همچنین در تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی درگیر است (Miyakawa et al., 2014).

بیان اختصاصی ژن‌ها به اصلاحگران برای گزینش به کمک نشانگر کمک خواهد کرد. در بررسی نوع ژن‌های پیام‌رسان، پروتئین‌های کینازی بیشترین سهم را داشتند، به‌طوری‌که از ۲۰ ژن شناسایی شده در مسیر RLK[19] در ریشه در زمان ۵۴ ساعت، تعداد ۱۳ ژن در رقم متحمل و هفت ژن در رقم حساس افزایش بیان داشتند. از ۱۳ ژن افزایش بیان یافته در رقم متحمل، بیشترین تعداد (پنج ژن) به زیر خانواده S-locus تعلق داشت که سه ژن دارای بیان بالا بودند (شکل ۲-ب). پروتئین‌های RLKs یک خانواده بزرگ از ژن‌ها هستند که دارای حداقل ۶۱۰ عضو در آرابیدوپسیس و ۱۱۳۲ عضو در برنج می‌باشند (Shiu et al., 2004).

RLKها پروتئین‌های تراغشایی هستند که دارای یک دمین خارج سلولی N-terminal و یک دمین کینازی C-terminal هستند که به‌عنوان تنظیم‌کننده از طریق فسفوریله کردن در فرایندهای مختلفی نظیر نمو، مقاومت به بیماری‌ها، تحمل به تنش‌ها، درک هورمون و خودناسازگاری در گیاهان نقش ایفا می‌کنند. بسیاری از RLKها جز پروتئین‌های غشای پلاسمایی محسوب می‌شوند اما ممکن است در مکان‌های دیگر نیز نقش داشته باشند، نظیر WAKها که به بخش پکتینی دیواره سلولی متصل می‌شوند (Lim et al., 2015). ژن OsSIK1 به‌عنوان یکی از مهم‌ترین کینازها موجب بهبود تحمل به خشکی و شوری در گیاهان تراریخته برنج از طریق فعال‌سازی سیستم آنتی‌اکسیدانی شد (Ouyang et al., 2010). در تحقیق حاضر ژن OsSIK1 (Os06g0130100) به‌صورت اختصاصی در ریشه رقم متحمل CSR28 در زمان تیمار شوری ۵۴ ساعت، افزایش بیان چشمگیر نسبت به رقم حساس IR28 نشان داد. همچنین ژن OsSAPK4 (Os05g0433100) در پاسخ به هورمون ABA و تیمار شوری در گیاهچه‌های برنج القا شد (Kobayashi et al., 2004) و در این تحقیق در زمان ۶ ساعت در اندام هوایی، بیان بیشتری در رقم متحمل نسبت به رقم حساس داشت.

یون کلسیم به‌عنوان یک پیام‌رسان عمومی ثانویه نقش کلیدی در مسیرهای انتقال پیام در گیاهان بازی می‌کند (Reddy, 2001). بسیاری از تنش‌ها نظیر گرما، سرما، تنش‌های اکسیداتیو و اسمزی و آلودگی پاتوژن، سلول‌های گیاهی را به افزایش غلظت یون Ca^{2+} سیتوزولی و انتقال پیام تحریک می‌کنند. پیغام‌های حاصل از تنش توسط حس‌گرهای یون کلسیم نظیر CBLها و CDPKها رمزگشایی می‌شوند و با فعال‌سازی آبشار فسفوریلاسیون در نهایت ژن‌های مربوط به تنش القا می‌شوند (Chen et al., 2011). CBLها در تقابل با یک گروه از کینازها، کمپلکس‌های CIPKs را به وجود می‌آورند که دارای یک دمین پروتئین کینازی سرین/ترئونین در ناحیه N-terminal و یک دمین NAF در ناحیه C-terminal هستند (Luan et al., 2009). تاکنون بیش از ۳۰ ژن OsCIPK در برنج شناسایی شده است. بیان بالای ژن‌های OsCIPK3، OsCIPK12 و OsCIPK15 به ترتیب تحمل به تنش‌های سرما، خشکی و شوری را در برنج القا کرده است (Xiang et al., 2007). در تحقیق حاضر ژن‌های OsCIPK05 (Os01g0206700) و OsCIPK09 (Os03g0126800) در ریشه در زمان ۵۴ ساعت، افزایش بیان در رقم متحمل نسبت به رقم حساس داشتند. ژن‌های OsCIPK14 (Os12g0113500) و OsCIPK15 (Os11g0113700) در هر دو اندام در زمان ۵۴ ساعت در رقم متحمل بیان بالاتر داشتند، درحالی‌که OsCIPK13 (Os01g0206300) تنها در اندام هوایی در زمان ۵۴ ساعت افزایش بیان در رقم متحمل نشان داد. کمپلکس پروتئینی ژن‌های SOS2 و SOS3 یکی از مهم‌ترین فرایندهای درگیر در پیام‌رسانی و فعال‌سازی ناقل یونی SOS1 است. ژن‌های OsCBL4 (SOS3) با شناسه Os05g0534400 و OsCIPK24 (SOS2) با شناسه Os06g0606000 به ترتیب در ریشه رقم متحمل CSR28 در زمان‌های ۵۴ و ۶ ساعت بیان بالاتری نسبت به رقم حساس IR28 نشان دادند.

برخلاف کینازها، فسفاتازها از طریق دفسفوریله کردن (حذف گروه فسفات) در انتقال پیام در شرایط تنش نقش ایفا می‌کنند (Luan, 2003). چرخه‌های فسفوریلاسیون-دفسفریلاسیون در تغییر و ضعیت سریع پروتئین‌ها از یک

[19] Receptor like kinase

حالت به حالت دیگر مؤثر است که باعث واکنش سریع‌تر گیاهان به تنش‌های محیطی می‌شود (You et al., 2014). در ژنوم برنج ۹۰ پروتئین فسفاتاز از نوع PP2C شناسایی شده است که نقش‌های کلیدی در مسیرهای پیام‌رسانی درگیر در واکنش به هورمون‌ها و تنش‌ها، تشکیل اندام و نمو گل دارند (Luan, 2003; Schweighofer et al., 2004; Singh et al., 2010). در تحقیق حاضر ژن OsPP2C1 (Os09g0325700) در هر دو اندام رقم متحمل CSR28 در زمان ۵۴ ساعت پس از وقوع تنش شوری، افزایش بیان معنی‌دار نسبت به رقم حساس IR28 نشان داد. به‌طورکلی این نتایج بیانگر نقش کلیدی ژن های درگیر در مسیر پیام‌رسانی در القای تحمل به شوری رقم CSR28 بود.

نتیجه‌گیری نهایی

ارقام متحمل به تنش شوری با بهره‌گیری از مسیرهای پیام‌رسانی مناسب، وقوع تنش را بهتر درک می‌کنند و در نهایت واکنش‌های اسمزی و یونی قویتری جهت مقابله با تنش نشان می‌دهند. در این تحقیق به کمک مطالعه RNA-Seq، تعداد زیادی ژن افتراقی در پاسخ به شوری با استفاده از ارقام برنج متحمل CSR28 و حساس IR28 در زمان‌های نمونه‌برداری ۶ و ۵۴ ساعت و اندام‌های ریشه و هوایی شناسایی شد. با مقایسه ارقام حساس و متحمل در شرایط اختصاصی تنش شوری، ۹۱ ژن درگیر در مسیر پیام‌رسانی شناسایی شد که ۲۷ ژن دارای بیان بالا بودند. پروتئین‌های کینازی RLK بیشترین سهم را داشتند. چندین ژن مهم که در پیام‌رسانی تنش‌های غیرزیستی درگیر هستند در این تحقیق دارای بیان بالاتر در رقم متحمل بودند. علاوه بر این، برخی ژن‌ها در تمامی شرایط در رقم متحمل بیان اختصاصی داشتند که برای گزینش به کمک نشانگر مفید خواهند بود. بیشترین اختلاف ارقام مربوط به اندام ریشه و زمان نمونه‌برداری ۵۴ ساعت بود که نشان‌دهنده اهمیت فعل‌وانفعالات ریشه در القای تحمل به شوری مخصوصاً با گذشت زمان بود.

قدردانی

از مؤسسه بین‌المللی تحقیقات برنج (IRRI)، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و دانشگاه HHU آلمان جهت تأمین بذور و امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Akbarzadeh Lelekami, M., Pahlevani, M. H., Zaynali Nezhad, K., Mahdavi Mashaki, K., PM Weber, A., Brilhaus, D., 2020. Response of some of primary metabolites in rice (*Oryza sativa* L.) root to salinity stress. Journal of Crop Breeding. 12, 210-217. [In Persian with English summary].

Andrews, S., 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc

Asano, T., Hayashi, N., Kobayashi, M., Aoki, N., Miyao, A., Mitsuhara, I., Kikuchi, S., 2012. A rice calcium-dependent protein kinase OsCPK12 oppositely modulates salt-stress tolerance and blast disease resistance. The Plant Journal. 69, 26-36.

Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 30, 2114-2120.

Chen, X. F., Gu, Z. M., Feng, L., Zhang, H. S., 2011. Molecular analysis of rice CIPKs involved in both biotic and abiotic stress responses. Rice Science. 18, 1-9.

Chinnusamy, V., Jagendorf, A., Zhu, J. K., 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. Crop Science. 45, 437-448.

Cotsaftis, O., Plett, D., Johnson, A. A., Walia, H., Wilson, C., Ismail, A. M., Close, T. J., Tester, M., Baumann, U., 2011. Root-specific transcript profiling of contrasting rice genotypes in response to salinity stress. Molecular Plant. 4, 25-41.

Howe, E. A., Sinha, R., Schlauch, D., Quackenbush, J., 2011. RNA-Seq analysis in MeV. Bioinformatics. 27, 3209-3210.

Hunter, M. C., Smith, R. G., Schipanski, M. E., Atwood, L. W., Mortensen, D. A., 2017. Agriculture in 2050: Recalibrating targets for sustainable intensification. Bioscience. 67, 386-391.

Jung, S.E., Bang, S.W., Kim, S.H., Seo, J.S., Yoon, H.-B., Kim, Y.S., Kim, J.K., 2021. Overexpression of OsERF83, a vascular tissue-specific transcription factor gene, confers drought tolerance in rice. International Journal of Molecular Sciences. 22, 7656.

Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Minami, H., Kagaya, Y., Hattori, T., 2004. Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1–related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. The Plant Cell. 16, 1163-1177.

Lim, C.W., Yang, S.H., Shin, K.H., Lee, S.C., Kim, S.H., 2015. The AtLRK10L1.2, Arabidopsis ortholog of wheat LRK10, is involved in ABA-mediated signaling and drought resistance. Plant Cell Reports. 34, 447-455.

Luan, S., 2003. Protein phosphatases in plants. Annual Review of Plant Biology. 54, 63-92.

Luan, S., 2009. The CBL–CIPK network in plant calcium signaling. Trends in Plant Science. 14, 37-42.

Mansuri, R.M., Shobbar, Z.S., Jelodar, N.B., Ghaffari, M.R., Nematzadeh, G.A., Asari, S., 2019. Dissecting molecular mechanisms underlying salt tolerance in rice: a comparative transcriptional profiling of the contrasting genotypes. Rice. 12, 13.

Mantri, N., Patade, V., Penna, S., Ford, R., & Pang, E., 2012. Abiotic stress responses in plants: present and future. Springer. 1-19.

Martínez-Atienza, J., Jiang, X., Garciadeblas, B., Mendoza, I., Zhu, J.-K., Pardo, J.M., Quintero, F.J., 2007. Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. Plant Physiology. 143, 1001-1012.

Miyakawa, T., Hatano, K.I., Miyauchi, Y., Suwa, Y.I., Sawano, Y., Tanokura, M., 2014. A secreted protein with plant-specific cysteine-rich motif functions as a mannose-binding lectin that exhibits antifungal activity. Plant Physiology. 166, 766-778.

Nagy, E.D., Lee, T.C., Ramakrishna, W., Xu, Z., Klein, P.E., SanMiguel, P., Schertz, K., 2007. Fine mapping of the Pc locus of *Sorghum bicolor*, a gene controlling the reaction to a fungal pathogen and its host-selective toxin. Theoretical and Applied Genetics. 114, 961-970.

Naithani, S., Dikeman, D., Garg, P., Al-Bader, N., Jaiswal, P., 2021. Beyond gene ontology (GO): using biocuration approach to improve the gene nomenclature and functional annotation of rice S-domain kinase subfamily. PeerJ. 9, e11052.

Nongpiur, R.C., Singla-Pareek, S.L., Pareek, A., 2020. The quest for osmosensors in plants. Journal of Experimental Botany. 71, 595-607.

Ouyang, S.Q., Liu, Y.F., Liu, P., Lei, G., He, S.J., Ma, B., Zhang, W.K., Zhang, J.S., Chen, S.Y., 2010. Receptor-like kinase OsSIK1 improves drought and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa*) plants. The Plant Journal. 62, 316-329.

Qiu, Q.S., Guo, Y., Dietrich, M.A., Schumaker, K.S., Zhu, J.K., 2002. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in Arabidopsis thaliana, by SOS2 and SOS3. Proceedings of the National Academy of Sciences. 99, 8436-8441.

Reddy, A. S., 2001. Calcium: silver bullet in signaling. Plant Science. 160, 381-404.

Saijo, Y., Hata, S., Kyozuka, J., Shimamoto, K., Izui, K., 2000. Over-expression of a single Ca^{2+}-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. The Plant Journal. 23, 319-327.

Schweighofer, A., Hirt, H., Meskiene, I., 2004. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. Trends in Plant Science. 9, 236-243.

Shiu, S.H., Karlowski, W.M., Pan, R., Tzeng, Y. H., Mayer, K.F., Li, W. H., 2004. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice. The Plant Cell. 16, 1220-1234.

Singh, A., Giri, J., Kapoor, S., Tyagi, A.K., Pandey, G.K., 2010. Protein phosphatase complement in rice: genome-wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development. BMC Genomics. 11, 1-18.

Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L.A., Rhee, S.Y., Stitt, M., 2004. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. The Plant Journal. 37, 914-939.

Todaka, D., Nakashima, K., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2012. Toward understanding transcriptional regulatory networks in abiotic stress responses and tolerance in rice. Rice. 5, 6.

Trapnell, C., Pachter, L., Salzberg, S.L., 2009. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. Bioinformatics. 25, 1105-1111.

Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J., Pachter, L., 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. Nature Biotechnology. 28, 511-515.

Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L., Pachter, L., 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. Nature Protocols. 7, 562-578.

Trapnell, C., Hendrickson, D. G., Sauvageau, M., Goff, L., Rinn, J.L., Pachter, L., 2013. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. Nature Biotechnology. 31, 46-53.

Vij, S., Giri, J., Dansana, P.K., Kapoor, S., Tyagi, A.K., 2008. The receptor-like cytoplasmic kinase (OsRLCK) gene family in rice: organization, phylogenetic relationship, and expression during development and stress. Molecular Plant. 1, 732-750.

Walia, H., Wilson, C., Zeng, L., Ismail, A.M., Condamine, P., Close, T. J., 2007. Genome-wide transcriptional analysis of salinity stressed japonica and indica rice genotypes during panicle initiation stage. Plant Molecular Biology. 63, 609-623.

Wang, C., Li, D., Wang, P., Chen, D., Chen, X., 2020. Genome-wide analysis of HAESA/HAESA-like kinase family in rice. American Journal of Plant Sciences. 11, 1254.

Xiang, Y., Huang, Y., Xiong, L., 2007. Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement. Plant Physiology. 144, 1416-1428.

Yoshida, S., Forno, D.A., Cock, J. H., 1971. Laboratory manual for physiological studies of rice. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. IRRI. 83p.

You, J., Zong, W., Hu, H., Li, X., Xiao, J., Xiong, L., 2014. A stress-responsive NAC1-regulated protein phosphatase gene rice protein phosphatase18 modulates drought and oxidative stress tolerance through abscisic acid-independent reactive oxygen species scavenging in rice. Plant Physiology. 166(4), 2100-2114.