هشتمین کنفرانس ملی
نوآوری و فناوری علوم زیستی و شیمی ایران
8th National Conference on Innovation and Technology in Biology and Chemistry of IRAN
www.bc.bcnf.ir

شناسایی میکروپروتئین‌ها برای پاسخ به تنش خشکی در گلرنگ

مهشید مهرشاد[1]، اسداله احمدی‌خواه[2]، ناصر فرخی[2]،

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی.

m.mehrshad7077@gmail.com

۲. اعضای هیئت علمی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی.

a_ahmadikhah@sbu.ac.ir

n_farrokhi@sbu.ac.ir

چکیده

گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) یک محصول دانه روغنی چند منظوره معتدله با تحمل بالا نسبت به تنش‌های محیطی مانند خشکی و شوری است که به دلیل داشتن روغن باکیفیت (لینولئیک و اولئیک اسید) و هم چنین رنگ خوراکی، از ارزش بالایی برخورداراست. تحقیقات اخیر در گیاهان نشان داده که میکروپروتئین‌ها می‌توانند برای سازگاری گیاهان با شرایط محیطی ایفای نقش کنند. از جمله شرایط تنشی مهم تنش خشکی است که در گیاه گلرنگ از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد ولی تاکنون نقش میکروپروتئین‌ها در پاسخ به تنش خشکی در این گیاه بررسی نشده است. این تحقیق به منظور مطالعه نقش کلیدی میکروپروتئین‌ها در تنظیم بیان ژن، در شرایط تنش خشکی انجام شد. برای بررسی بیان ژن‌های کاندیدا از روش پی‌سی‌آر در زمان واقعی (شرایط آبیاری کامل و تنش خشکی) استفاده شد. بر اساس الگوریتم MipFinder تعداد ۵۲ میکروپروتئین بالقوه به همراه پروتئین‌های هدف متناظر با آن‌ها شناسایی شد. بررسی بیان نسبی ژن نشان داد که ۵ میکروپروتئین دارای تغییر معنی‌دار بیان نسبی در شرایط تنش خشکی بودند. نتایج این مطالعه به درک ما از چگونگی پاسخ به تنش خشکی در گلرنگ به کمک میکروپروتئین‌ها کمک خواهد کرد.

کلمات کلیدی: میکروپروتئین ، تنش خشکی ، گلرنگ

مقدمه

تنش خشکی یکی از جدی ترین مشکلات در سطح جهان برای کشاورزی است. گیاهان مکانیسم‌های سازگاری خاصی را برای پاسخ به تنش خشکی و زنده ماندن توسعه داده‌اند یک رویداد مهم در پاسخ به تنش در سطح مولکولی، ادراک و انتقال سیگنال‌های

تنش از طریق اجزای سیگنال‌دهنده است که منجر به فعال شدن ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش می‌شود. تحمل به خشکی یک صفت چند ژنی است که مستلزم مشارکت مجموعه پیچیده‌ای از ژن ها می‌باشد. با ظهور رویکرد ژنومیک عملکردی، می‌توان عملکرد این ژن‌ها را درک کرد. تعداد زیادی از ژن‌های پاسخ به خشکی در طیف وسیعی از گونه های گیاهی شناسایی شده است. این ژن‌ها با تولید پروتئین‌های متابولیکی مهم و تنظیم ژن‌هایی که انتقال سیگنال را در پاسخ به تنش خشکی کنترل می‌کنند، از سلول‌ها در برابر کمبود آب محافظت می‌کنند[1]. تنش خشکی باعث کاهش ارتفاع بوته، شاخص سطح برگ، وزن هزار دانه، عملکرد دانه، عملکرد بیولوژیکی، شاخص برداشت، SPAD، محتوای روغن، عملکرد روغن، مقادیر اسید پالمیتیک و اسید لینولئیک می شود[2]. میکروپروتئین‌ها (miPs) پروتئین های کوچک 5 تا 20 کیلو دالتونی با یک دامین برای برهم‌کنش پروتئین-پروتئین هستند.

متن

پیش‌بینی می‌شود که میکروپروتئین‌ها از نظر تکاملی با پروتئین‌هایی که با آن‌ها تعامل دارند مرتبط باشند. به نظر می‌رسد که میکروپروتئین‌ها پس از تکرارها و حذف‌ها در ژن‌های کدکننده پروتئین‌های چند دامینی بزرگ به وجود آمده‌اند[3]. در یک مسیر سیگنالینگ معمولی، miPs در تنظیم دقیق فعالیت پروتئین‌ها در سطح پس از ترجمه نقش دارند[4]. میکروپروتئین‌ها به دو نوع *cis*-miPs و *trans*-miPs طبقه‌بندی می‌شوند. *Cis*-miPها از ایزوفرم‌های mRNA در اثر پیرایش متفاوت کدگذاری می‌شوند. *Trans*-miPها در اثر دو برابر شدگی ژنی و حذف یک دامین در این فرآیند پدید آمده‌اند [5].مطالعات نشان داده است که میکروپروتئین‌های شناخته‌شده گیاهی نقش تنظیمی در عمل فاکتورهای رونویسی دارند[6]. علاوه بر این، نشان داده شده است که عوامل رونویسی را می توان با بیش‌بیان دامین برهم‌کنش پروتئین-پروتئین مربوطه تنظیم کرد. ژن سرکوب کننده بیش‌بیان CONSTANS1، AGAMOUS، و LATE Elongated Hypocotyl در آرابیدوپسیس و *Brachypodium distachyon* را می توان با بیش‌بیان دامین‌های برهم‌کنش پروتئین-پروتئین مربوطه آنها به طور منفی تنظیم کرد[7]. میکروپروتئین‌ها می‌توانند به تنظیم عمل پروتئین‌های چند دامینی بزرگتر از طریق ایجاد اختلال در تشکیل کمپلکس‌های پروتئینی بپردازند[8]. اگرچه *RNA-seq* به عنوان یک فناوری قدرتمند و به سرعت در حال تکامل تنها چند سالی است که در دسترس است، در حال حاضر کمک قابل توجهی به درک ما از بیان و تنظیم ژنوم می‌کند[9]. در گلرنگ جهت تجزیه و تحلیل بیان ژن و برای رونویسی از این فناوری استفاده می شود .اگر توالی ژنوم برای ارگانیسم مورد مطالعه در دسترس باشد، باید بتوان رونوشت ها را با نگاشت *RNA-seq* خوانده شده بر روی ژنوم شناسایی کرد. *RNA-seq* می تواند به تنهایی برای پروفایل رونویسی یا در ترکیب با سایر روش‌های ژنومیک عملکردی برای افزایش تجزیه و تحلیل بیان ژن استفاده شود .هنگامی که یک ژنوم مرجع در دسترس است، تجزیه و تحلیل *RNA-seq* معمولاً شامل نگاشت قرائت‌ها بر روی ژنوم مرجع یا رونوشت می‌شود تا استنباط کند که کدام رونوشت‌ها بیان می‌شوند[10].*MicroRNA* نقش مهمی در پاسخ های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به تنش های مختلف از جمله تنش خشکی در گیاه گلرنگ ایفا می کنند.تنشهای محیطی با تأثیر بر الگوهای بیان ژن بر رشد و نمو گیاهان تأثیر می گذارد. تنظیم کننده های مختلف بیان ژن را کنترل می کنند، از جمله فاکتورهای رونویسی (TFsو microRNA ها. MicroRNA ها (miRNA ها: ~21 نوکلئوتید طول) توسط ژن های miRNA رونویسی شده توسط RNA پلیمراز *II (RNP-II)* کدگذاری می شوند و نقش های کلیدی در رشد و فیزیولوژی گیاه دارند. تجزیه و تحلیل هستی شناسی ژن (GOنشان داد که ژن های هدف miRNA ها اغلب TF هایی مانند AP2/ERF و HD-ZIP و همچنین پروتئین های حاوی دامنه NAC هستند[11]. اولین خانواده miP گزارش شده درگیاهان از خانواده پروتئین های LITTLE ZIPPER (ZPR) بودند .دارای زیپ لوسین است دامنه ای که از طریق آن تعامل می کند و به صورت پس از ترجمه سایر مواد حاوی زیپ لوسین را تنظیم می کند[4] . تجزیه و تحلیل بیان تایید کرد که miRNA ها می توانند نقشی حیاتی در مقاوم نگه داشتن گلرنگ در برابر تنش ایفا کنند[11]. بیان افتراقی miR156،

miR162، miR164، miR166، miR172، miR398 و miR408 بیان ژن‌های هدف مربوطه را تنظیم می‌کند. این ژن ها چندین مسیر را فعال می کنند که منجر به پاسخ های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به تنش های غیرزیستی می شود. برخی از miRNA های حفاظت شده توسط تنش های غیرزیستی تنظیم می شدند [11]. با توجه به کشف microRNA ها (miRNA ها) و شناخت عملکرد آنها در سال های اخیر، امکان پذیر است که این ها نقش مهمی در رشد گلرنگ و بازخورد گیاه به تنش های زیستی و غیرزیستی داشته باشند. MiRNA ها شامل مولکول های جدید ncRNA هستند و طولی در حدود 21-25 nt دارند. آنها بیان طیف گسترده ای از ژن ها را در سطح پس از رونویسی از طریق مهار ترجمه ژن یا سرکوب mRNA های هدف از طریق جفت شدن با mRNA های هدف خود به طور منفی تنظیم می کنند .برای تایید miRNA های پیش بینی شده و رابطه متقابل بین miRNA ها و ژن های هدف آنها، و همچنین تجزیه و تحلیل الگوی بیان miRNA ها، SL RT-PCR و qRT-PCR به ترتیب برای نشان دادن سطح بیان هفت miRNA و هفت ژن هدف انجام شد.گزارش‌های اخیر نشان داده‌اند که هفت miRNA ذکر شده (miR156، miR162، miR164، miR166، miR172، miR398، و miR408)نقش مهمی در پاسخ‌های گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارند .در واقع، miRNA ها تنها در برخی از اندام ها و در پاسخ به تنش های محیطی بیان می شوند.به عنوان مثالخانواده *miR398* الگوهای بیان متفاوتی را در پاسخ به تنش‌ها در گلرنگ نشان داده‌اند. جالب توجه است، ما دریافتیم که سطح *miR398* پس از درمان خشکی در هر دو اندام ریشه و برگ کاهش یافت و همچنین با ژن هدف آنها همبستگی منفی دارد که نشان‌دهنده پاسخی به بافت خاص است که توسط این *miRNA* هدایت می‌شود. می توان نتیجه گرفت ، در سطح مولکولی، *miR398*می تواند نقش مهمی در شبکه های تنظیمی مقاومت به خشکی ایفا کند[11]. بسیاری از متابولیتها نقش مهمی در تحمل تنش ایفا می کنند که باعث شده است محققان بیشتری به پاسخ متابولیکی گیاه به تنش خشکی توجه کنند. و متابولیت‌ها هدف بهتری برای بهبود تحمل به خشکی نسبت به یک ژن واحد بودند زیرا همیشه از تعامل ژن‌ها و مسیرهای مختلف ناشی می‌شد که منجر به یک اثر سیستمیک در پاسخ به تنش می‌شد . از این رو، ترانسکریپتوم و متابولومیک یک روش بیولوژیکی سیستماتیک بودند که ابزاری قدرتمند برای توضیح ویژگی های پیچیده مانند مقاومت به خشکی، تحمل به نمک، دمای پایین و تنش دمای بالا بود. بسیاری از ژن ها و مسیرهای مختلف به افزایش تحمل در برابر تنش آب کمک می کنند. مکانیسم‌های تحمل تنش عمدتاً شامل تنظیم اسمزی، مسیرهای انتقال سیگنال منجر به بسته شدن روزنه، بیوسنتز اسید آبسیزیک، سایر مکانیسم‌های تحمل با واسطه‌ی پیام‌رسان‌های مختلف، و رونویسی و تنظیم پس از رونویسی ژن‌های عملکردی مختلف مرتبط با تحمل بود [12]. پس از استخراج *RNA* از برگ گلرنگ در مرحله پنجه دهی و سپس طراحی و سنتز پرایمر برای 4 ژن بیان شده در گلرنگ *Real Time PCR* انجام شد که این فناوری تغییرات بیان ژن را بررسی می کند.

مواد و روش‌ها

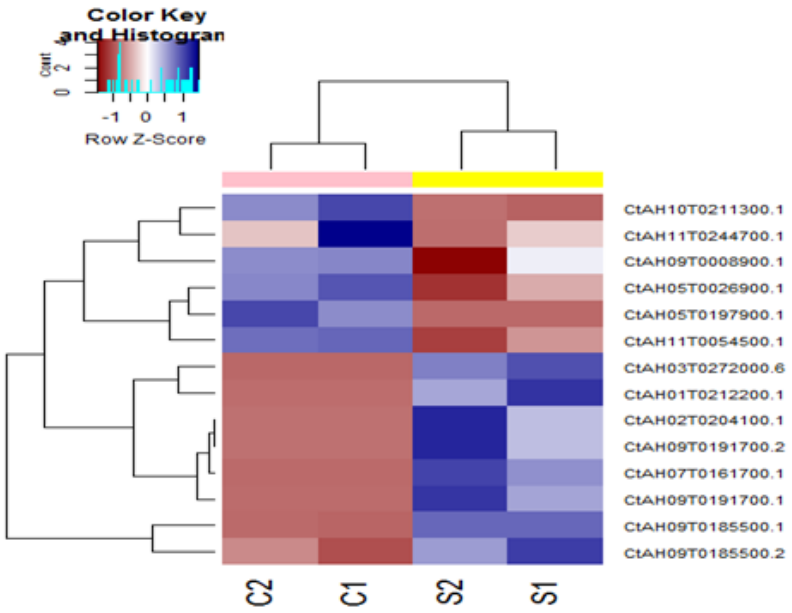
شناسایی میکروپروتئین‌ها با روش مبتنی بر همولوژی با الگوریتم MipFider در مقابل همه پروتئین‌های گلرنگ انجام شد. در این روش پس از تهیه لیست میکروپروتئین‌ها بر اساس همولوژی پروتئین‌های هدف و میکروپروتئین‌های کاندیدای بالقوه با فرمول امتیازدهی انتخاب شدند[13]. برای بررسی بیان ژن های کدکننده میکروپروتیین ها و پروتئین های هدف آنها از داده های RNAseq گیاه گلرنگ تحت شرایط تنش و بدون تنش (که قبلا در تیم تحقیقاتی ما تولید شده بود) استفاده شد. خوانش های کوتاه با برنامه Hisat2 روی ژنوم رفرنس مکانیابی شد و داده های شمارش ترانسکریپت‌های مکانیابی شده پس از نرمال‌سازی با پکیج‌های edgeR و limma در برنامه R آنالیز شد و در نهایت ژن های با بیان افتراقی (DEGs) تحت تنش خشکی شناسایی شد.

نتایج و بحث

بر اساس روش مبتنی برهمولوژی با الگوریتم *mipfinder* در *گلرنگ* ، تعداد6902 میکروپروتئین اولیه و37031 تارگت بالقوه مورد بررسی قرار گرفتند. طبق الگوریتم یاد شده تعداد ۵۲ میکروپروتئین بالقوه شناسایی شد. سپس بیان این ژنها را با روش RNAseq بررسی کردیم. نتایج نشان داد که ۵ میکروپروتئین و ۵ تارگت متناظر با آنها دارای بیان افتراقی بودند (جدول ۱). ۲ و ۳ میکروپروتئین به ترتیب دارای بیان نسبی افزایشی و کاهشی بودند. این در حالی است که تارگت های متناظر با آنها لزوما دارای بیان مشابهی نبودند شکل ۱). میکروپروتئین‌های دارای افزایش بیان عبارت بودند از CtAH02T0200000 و CtAH10T0004100 (به ترتیب کد کننده Cellulose-synthase-like C6 و lipid transfer protein 4) و میکروپروتئین‌های دارای کاهش بیان عبارت بودند از CtAH12T0125100 و CtAH09T0247200 و CtAH09T0207900 (به ترتیب کد کننده cytochrome P450 و photosystem I subunit E-2 و Yippee family putative zinc-binding protein).

جدول ۱- میکروپروتئین‌های و پروتئین‌های هدف متناظر با آن‌ها.

MIP	Description	Expression type	Target	Description	Expression type
CtAH02T0200000.1	Cellulose-synthase-like C6	Up	CtAH02T0199700.1	plant U-box 9	Up
CtAH12T0125100.1	cytochrome P450 family protein	Down	CtAH05T0028600.1	NA	Up
CtAH09T0247200.1	photosystem I subunit E-2	Down	CtAH08T0295400.1	photosystem I reaction center subunit IV	Down
CtAH10T0004100.1	lipid transfer protein 4	Up	CtAH10T0138500.1	lipid transfer protein 4	Unchanged
CtAH09T0207900.1	Yippee family putative zinc-binding protein	Down	CtAH09T0208000.1	Yippee family putative zinc-binding protein	Unchanged



شکل ۱- نمودار حرارتی (هیت مپ) که بیانگر الگوی بیانی ژنهای رمزکننده میکروپروتئین‌ها و تارگت‌های متناظر با آنها در شرایط نرمال (C1 و C2) و تنش خشکی (S1 و S2) است.

منابع

1. Thippeswamy, M., Sivakumar, M., Sudhakarbabu, O., Chandraobul Reddy, P., Veeranagamallaiah, G., Pandurangaiah, M., ... & Sudhakar, C. (2013). Generation and analysis of drought stressed subtracted expressed sequence tags from safflower (Carthamus tinctorius L.). Plant Growth Regulation, 69, 29-41.

2. Manvelian, J., Weisany, W., Tahir, N. A. R., Jabbari, H., & Diyanat, M. (2021). Physiological and biochemical response of safflower (Carthamus tinctorius L.) cultivars to zinc application under drought stress. Industrial Crops and Products, 172, 114069.

3. Straub, D., & Wenkel, S. (2017). Cross-species genome-wide identification of evolutionary conserved MicroProteins. Genome biology and evolution, 9(3), 777-789.

4. Kushwaha, A. K., Dwivedi, S., Mukherjee, A., Lingwan, M., Dar, M. A., Bhagavatula, L., & Datta, S. (2022). Plant microProteins: Small but powerful modulators of plant development. Iscience, 25(11).

5. Eguen, T., Straub, D., Graeff, M., & Wenkel, S. (2015). MicroProteins: small size–big impact. Trends in plant science, 20(8), 477-482.

6. Seo, P. J., Hong, S. Y., Ryu, J. Y., Jeong, E. Y., Kim, S. G., Baldwin, I. T., & Park, C. M. (2012). Targeted inactivation of transcription factors by overexpression of their truncated forms in plants. The Plant Journal, 72(1), 162-172.

7. Staudt, A. C., & Wenkel, S. (2011). Regulation of protein function by 'microProteins'. EMBO reports, 12(1), 35-42.

8. Kim, Y. S., Kim, S. G., Lee, M., Lee, I., Park, H. Y., Seo, P. J., & Park, C. M. (2008). HD-ZIP III activity is modulated by competitive inhibitors via a feedback loop in Arabidopsis shoot apical meristem development. The Plant Cell, 20(4), 920-933.

9. Marguerat, S., & Bähler, J. (2010). RNA-seq: from technology to biology. Cellular and molecular life sciences, 67, 569-579.

10. Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., ... & Mortazavi, A. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. Genome biology, 17, 1-19.

11. Kouhi, F., Sorkheh, K., & Ercisli, S. (2020). MicroRNA expression patterns unveil differential expression of conserved miRNAs and target genes against abiotic stress in safflower. PLoS One, 15(2), e0228850.

12. Wei, B., Hou, K., Zhang, H., Wang, X., & Wu, W. (2020). Integrating transcriptomics and metabolomics to studies key metabolism, pathways and candidate genes associated with drought-tolerance in Carthamus tinctorius L. under drought stress. Industrial crops and products, 151, 112465.

13. Bhati, K. K., Blaakmeer, A., Paredes, E. B., Dolde, U., Eguen, T., Hong, S. Y., ... & Wenkel, S. (2018). Approaches to identify and characterize microProteins and their potential uses in biotechnology. Cellular and Molecular Life Sciences, 75, 2529-2536.

Identification of drought stress-responsive microproteins in safflower

Abstract

Safflower (*Carthamus tinctorius*) is a moderate multi-purpose oilseed product with high tolerance to environmental stresses such as drought and salinity, which is of high value due to its high-quality oil (linoleic and oleic acid) and food coloring. Recent research in plants has shown that microproteins can play a role in adapting plants to environmental conditions. One of the important stress conditions is drought stress, which is of great importance in safflower plant, but the role of microproteins in response to drought stress in this plant has not been investigated yet. This research was conducted in order to study the key role of microproteins in the regulation of gene expression under drought stress conditions. Real-time PCR (full irrigation and drought stress conditions) was used to investigate the expression of Candida genes. Based on the MipFinder algorithm, 52 potential microproteins were identified along with their corresponding target proteins. Analysis of relative gene expression showed that 5 microproteins had a significant change in relative expression under drought stress conditions. The results of this study will contribute to our understanding of how to respond to drought stress in safflower with the help of microproteins.

Key words: microprotein, drought stress, safflower