مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۷، شماره ۱، بهار ۱۴۰۳

چاپی ISSN 2717-0632 الکترونیکی،ISSN 2716-9804

آنالیز شبکه همبستگی ژن‌های پاسخ دهنده به تنش شوری در گیاه *Suaeda salsa*

نوع مقاله: پژوهشی

شیما جمالی‌راد[۱]، محمدرضا عظیمی[۲]، محمدرضا غفاری[۳]*

[۱]- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

[۲]- دانشیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

[۳]- دانشیار بخش زیست شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی و کشاورزی کرج، کرج، ایران

mrghaffari52@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۲۶، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۰۷

صفحه ۹۲-۷۸

چکیده

تنش شوری یکی از مهترین تنش‌های غیرزیستی است که منجر به خسارات قابل توجهی در تولید محصولات کشاورزی به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک می‌شود. به منظور شناسایی ژن‌های کلیدی درگیر در تحمل به شوری، *Suaeda slsa* با ظرفیت سازگاری با سطوح شوری بالا، در سطح ترنسکریپتوم مورد بررسی قرار گرفت. توالی‌یابی RNA، در سطوح شوری ۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی مولار توصیف کارآمدی را از پروفایل بیان ژن‌ها، در طول تنش نشان داد. با این حال، این بررسی‌ها معمولاً بر غربالگری ژن‌ها با بیان متفاوت تمرکز می‌کنند و میزان همبستگی بین ژن‌های درگیر در تنش شوری را مورد بررسی قرار نمی‌دهند. بنابراین در این تحقیق، شبکه همبستگی ۵۰ ژن کاندیدای پاسخ دهنده به تنش شوری با logFC>2 درمقایسه با شاهد مورد بررسی قرار گرفت. شبکه همبستگی حاصل از ۸۴۸ برهمکنش ژنی نشان داد که این ژن ها می توانند در سه کلاستر طبقه بندی شوند. آنالیز هستی شناسی و مسیر های عملکردی ژن ها با استفاده از پایگاه داده KEGG نشان داد متابولیسم گلی‌اگزالات و دی کربوکسیلات تنها مسیر غنی شده در پاسخ به تنش شوری است.

واژه‌های کلیدی: تنش‌های غیرزیستی، توالی‌یابی RNA، شورزی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.1.5.3]

مقدمه

تنش شوری یکی از رایج‌ترین تنش‌های غیرزیستی بوده و یک تهدید جدی برای امنیت غذایی و کشاورزی پایدار به‌ویژه در مناطقی که آب آبیاری یا آب‌های زیرزمینی شور دارند، به‌حساب می‌آید (Hernández, 2019; Li and liu 2019). هالوفیت‌ها به دلیل توانایی ذاتی که برای رشد در محیط‌های با شوری بالا دارند، نقش مهمی را در کشاورزی شورزیست ایفا می‌کنند. این گیاهان، مکانیسم‌های تطبیقی منحصر به فردی را ایجاد کرده‌اند که آن‌ها را قادر می‌سازد در محیط‌های با شوری بالا رشد کنند (Meng et al. 2018; Rahman et al. 2021). این مکانیسم‌های تطبیقی طیف وسیعی از فرآیندهای فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی را شامل می‌شوند که در مجموع منجر به افزایش تحمل آن‌ها به شوری می‌گردد (Meng et al. 2018). درک این مکانیسم‌ها می‌تواند بینش‌های ارزشمندی را در مورد افزایش تحمل به شوری در محصولات مهم اقتصادی ارائه و به کشاورزی پایدار در محیط‌های شور کمک نماید. بنابراین، درک واکنش هالوفیت‌ها به سطوح مختلف شوری در سطح ژنوم و ترنسکریپتوم، جزئیاتی را در مورد چگونگی بهبود ساختار ژنتیکی آن‌ها در افزایش تحمل به شوری ارائه می‌دهد (Abdellaoui et al. 2023; Grigore and Vicente, 2023).

توسعه فناوری‌های توالی‌یابی به محققان این امکان را داده است که از روش RNA-seq برای شناسایی و مقایسه الگوی بیانی ژن‌هایی که در تحمل به شوری نقش دارند استفاده کنند (Hosseini et al. 2023). با ظهور پلتفرم‌های با توان بالا در علوم زیستی، تجزیه و تحلیل داده‌های زیستی و ادغام آن‌ها با داده‌های دیگر به یک عنصری کلیدی تبدیل شده است. ابزارهای زیادی توسعه یافته‌اند که با مشکل یکپارچه‌سازی داده‌ها در زمینه‌های مختلف، مقابله می‌کنند (Toubiana et al. 2020). تجزیه و تحلیل شبکه روشی موثر برای ترکیب داده‌های تجربی به دست آمده از سطوح مختلف مولکولی با داده‌های مولکولی موجود می‌باشد (Grennan et al. 2014). شبکه‌ها با مجموعه‌ای از گره‌هایی که توسط لبه‌ها به هم متصل می‌شوند تعریف می‌شوند و نقش فزاینده‌ای را در بیولوژی ایفا می‌کنند (Kleyer et al. 2019). یکی از انواع شبکه‌ها، شبکه‌های همبستگی می‌باشند که درآن متغیرها (مانند ژن‌ها، متابولیت‌ها) به عنوان گره‌های شبکه، و همبستگی‌های زوجی بین آن‌ها، به عنوان لبه‌های وزن‌دار نشان داده می‌شوند (لبه‌ها بدون جهت بوده و می‌توانند بر اساس میزان همبستگی وزن بگیرند) (Proulx et al. 2005; Grennan et al. 2014; Kleyer et al. 2019). در شبکه‌های همبستگی ژن، از داده‌های رونویسی (میزان بیان

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.1.5.3]

ژن ها در تیمارهای گوناگون) برای محاسبه فاصله شباهت ژن‌ها براساس ضریب همبستگی پیرسون (PCC) استفاده می‌شود. این روش می‌تواند به طور همزمان، الگوهای بیانی تعداد زیادی ژن را در شرایط تنش مورد بررسی قرار دهد (Zainal-Abidin et al. 2022; Bano et al. 2022). خوشه‌های این شبکه با وجود اتصالات قوی بین ژن‌های کاندید، به عنوان مسیرهای زیستی درگیر در یک مطالعه، مشخص می‌شوند و این امکان را فراهم می‌کند که نگاه جامع‌تری به فرآیند مورد مطالعه داشته باشیم (Yi et al. 2007). معیارهای مرکزیت یک شبکه را می‌توان با تعداد اتصالات منتهی به یک ژن و موقعیت یک ژن توصیف کرد (Proulx et al. 2005). بر این اساس، ژن‌های هاب با بیشترین تعداد برهمکنش (با ژن‌های دیگر) به عنوان معیارهای مرکزیت شبکه‌های ژنی شناخته می‌شوند و اثرات قوی بر روی عملکرد ژن‌های مرتبط دارند (Cohen and Havlin, 2010; Li et al. 2023). همچنین، ارتباط ژن‌های خاص را می‌توان با موقعیت توپولوژیکی آن‌ها در شبکه تعریف نمود. به طوری که ژن‌ها با همبستگی‌های بالا تمایل دارند در ماژول‌های کوچک‌تر گروه‌بندی شوند، این ژن‌ها اغلب، یا دارای عملکردهای مشابهی بوده و یا در مسیرهای یکسانی قرار می‌گیرند (Cohen and Havlin, 2010). گیاه *Suaeda salsa* یک شبه هالوفیت یکساله با ارزش غذایی و دارویی بالا و قابلیت رشد در مناطق ساحلی و خاک‌های شور می‌باشد. کشت این گیاهان در مناطق شور، بهبود کشاورزی و احیای اکوسیستم‌های آسیب دیده در این مناطق را به همراه دارد (Song and Wang, 2015; Wang and Liu, 2024). این گیاه، به علت داشتن ژن‌ها و مکانیسم‌های ناشناخته تحمل به شوری، می‌تواند کاندید مناسبی برای مطالعات شبکه و درک همبستگی بین ژن‌ها باشد (به منظور کشف عملکرد ژن‌ها و درک بهتر مکانیسم‌های تحمل) (Song and Wang, 2015; Guo et al. 2021). در این مطالعه، با داده‌های حاصل از رونویسی گیاه *S. salsa* در سطوح مختلف شوری، شبکه همبستگی ۵۰ ژن پاسخ دهنده به تنش شوری ترسیم شد. تجزیه و تحلیل‌ها نیز، بر اساس میزان همبستگی ژن‌ها برای شناسایی ماژول‌های عملکردی و ژن‌های هاب در طول تنش صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه *S. salsa* از منطقه ساحلی بندرگز واقع در استان گلستان با مشخصات جغرافیایی 36°47′16.1″N and 53°56′30.5″E جمع‌آوری و در سطوح شوری ۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌مولار کشت شدند. بعد از استخراج RNA از نمونه‌های گیاهی (Ling et al. 2013)، توالی‌یابی نمونه‌ها از تکرارهای دوتایی از تمام سطح شوری صورت

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.1.5.3]

گرفت. کنترل کیفیت داده‌ها بعد از توالی‌یابی با استفاده از نرم افزار fastQC انجام شد و خوانش‌های خام از هر کتابخانه در ابتدا با حذف توالی‌های آداپتور و حذف درصد بالایی از خوانش‌های بی‌کیفیت (Q-vqlue<20) توسط نرم افزار Trimmomatic V 0.36 فیلتر و خوانش‌های فیلتر شده نیز با نرم افزار Rcorrector برای حذف خطاهای توالی اصلاح شدند. رونوشت‌های تصیح شده حاصل از سایر کتابخانه ها باهم ادغام شده و توسط نرم افزار Trinity (version2.2.0) براساس پارامترهای پیش فرض اسمبل شدند (Hass et al. 2013). رونوشت‌های کوتاهتر از ۲۰۰ جفت باز کنار گذاشته شده و طولانی‌ترین رونوشت در هر خوشه به عنوان نماینده‌ای از آن یونی ژن انتخاب شد. اسمبل‌های تکمیل شده توسط ارتولوگ‌های تک نسخه و پارامترهای پیش فرض از نسخه دوم نرم افزار BUSCO موردارزیابی قرار گرفتند(Simão et al. 2015). هر جفت از خوانش‌های تصحیح شده با استفاده از نرم‌افزار Bowtie2 روی رونوشت‌های سرهم شده مونتاژ و میزان بیان هر یک از یونی ژن‌ها در نرم‌افزار RSEM محاسبه شدند (Li and Dewey, 2011). حاشیه نویسی عملکردی unigenes با استفاده از نرم افزار Blast 2GO برای Blastx در مقابل NCBI non-redundant protein database با آستانه $1e^{-3}$ برای evalue صورت گرفت. آنالیز ژن‌های افتراقی نیز توسط نرم‌افزار R نسخه ۴.۳.۱ و پکیج edgeR انجام شد. برای این منظور، ابتدا کلیه خوانش‌ها با استفاده از روش TMM نرمال‌سازی شدند وکمی‌سازی ژن‌های افتراقی (DEG) بین تیمارهای شوری (۲۰۰ میلی‌مولار، ۴۰۰ میلی‌مولار و ۸۰۰ میلی‌مولار) و شاهد (۰ میلی‌مولار) با استفاده از مقایسات جفتی صورت گرفت. مقادیر FDR < 0.05 و |logFC| نیز برای شناسایی ژن‌های افتراقی در نظر گرفته شدند. این معیارها برای افزایش اعتبار نتایج بدست آمده انتخاب شدند و تمایز واضحی را بین ژن‌های افتراقی و غیرافتراقی ارائه نمودند (Jamalirad et al. 2023).

۵۰ ژن پاسخ‌دهنده به تنش شوری بر اساس بیان متفاوت آن‌ها در طی تیمارهای مختلف انتخاب (با آستانه logFC>2) و به عنوان مرجع در شبکه همبستگی ژن در نظر گرفته شدند. از ضریب همبستگی پیرسون برای تجزیه و تحلیل میزان همبستگی بین ژن‌های کاندید در غالب پکیج Corplot استفاده شد. آزمون آستانه برای ضریب همبستگی r>0.5 برای ترسیم شبکه همبستگی ژن و r> 0.95 و p-value<0.01 نیز برای ترسیم ماژول‌ها مورد استفاده قرار گرفت. شبکه همبستگی و ماژول‌های شبکه همبستگی نیز در نرم افزار Cytoscape نسخه ۳.۹.۱ ترسیم شدند. آنالیز GO (Gene Ontology) برای ژن¬های انتخابی و

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

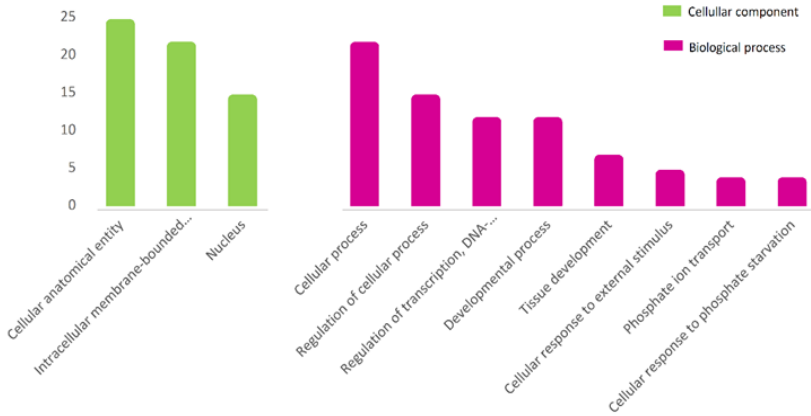
[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.1.5.3]

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) برای کلاسترهای شبکه ژنی و ماژول‌های حاصل، با استفاده از دیتابیس String صورت گرفت.

نتایج و بحث

آنالیز ژن‌های افتراقی (DEG) بین تیمارهای شوری (۲۰۰ میلی‌مولار، ۴۰۰ میلی‌مولار و ۸۰۰ میلی‌مولار) و شاهد (۰ میلی‌مولار) با استفاده از مقایسات جفتی صورت گرفت و ۵۰ ژن انتخابی که پاسخ خوبی نسبت به تیمار شوری را نشان داده بودند از بین کلیه ژن‌های افتراقی انتخاب شدند و برای رسم شبکه ژنی در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند.

آنالیز هستی¬شناسی مربوط به ژن‌ها با استفاده از پایگاه داده String صورت گرفت و درمجموع، حدود ۳۰ ژن از ۵۰ ژن مورد مطالعه، هستی شناسی شدند که از لحاظ سلولی در دو دسته اجزای سلولی و فرآیند زیستی قرار گرفتند. در بخش اجزای سلولی، بیشتر ژن‌ها در ساختار آناتومیکی داخل سلولی و اجزاء ذاتی غشاء دسته‌بندی شدند. دربخش فرایندهای زیستی، اکثر ژن‌ها در مسیرهای مهمی چون فرایندهای سلولی، فرایندهای تنظیمی در سطح سلول و فرایندهای تنظیمی در سطح DNA غنی شدند. نتایج حاصل نشان می‌دهد که تحت استرس شوری بسیاری از پروتئین‌های ساختاری و غشایی گیاه *S. salsa*، در معرض تغییرات ساختاری قرار می گیرند، بنابراین حفظ عملکرد آن‌ها برای بقای سلول در شرایط تنش، حیاتی است. همچنین غنی شدن فرایندهای تنظیمی در سطح سلول و در سطح DNA حاکی از اهمیت بالای این مسیرها تحت استرس شوری دارد (Meng et al. 2018; Banik et al. 2023).



شکل ۱- آنالیز هستی شناسی ۵۰ ژن پاسخ دهنده به تنش شوری

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.1.5.3]

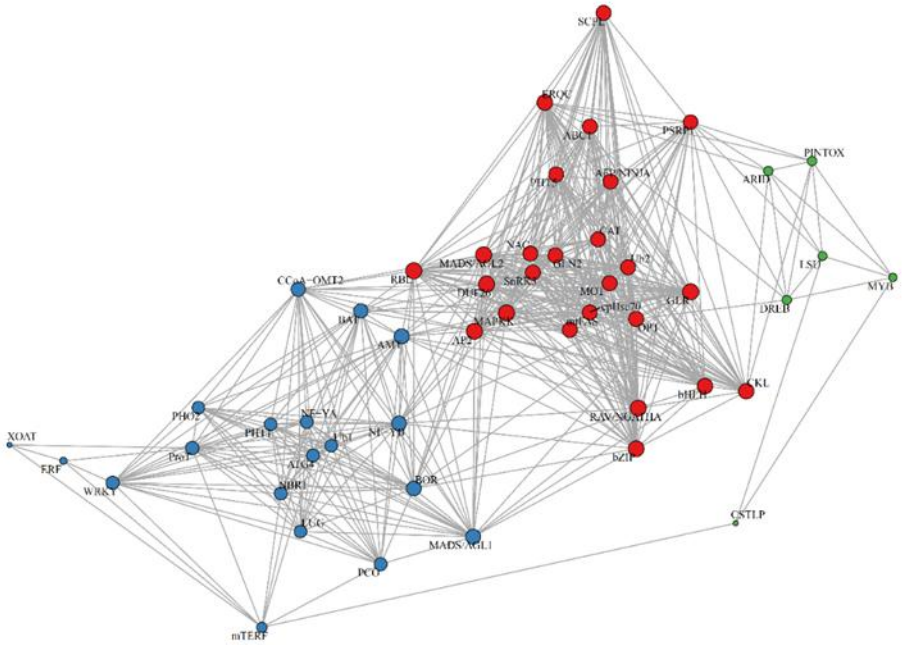
شبکه ژنی ژن‌های پاسخ دهنده به تنش شوری

فن‌آوری‌های توالی‌یابی RNA، توصیفی کارآمد و جامعی را از پروفایل‌های بیان ژن، در طول زمان ایجاد می‌کنند. با این حال، این بررسی‌ها معمولاً بر غربالگری ژن با بیان متفاوت تمرکز می‌کنند، در حالی که درجه ارتباط بین ژن‌های درگیر را مورد بررسی قرار نمی‌دهند. از آنجایی که ژن‌های با الگوهای بیانی مشابه، ممکن است از نظر عملکردی نیز مرتبط باشند، شناسایی ژن‌ها با بیان همبسته می‌تواند عملکردهای احتمالی ژن‌های ناشناخته را نیز روشن کند (Farhadian et al. 2021). براین اساس در مطالعه حاضر، شبکه همبستگی ۵۰ ژن پاسخ دهنده به تنش شوری (با logFC>2 در مقایسه با شاهد) با ۸۴۸ برهمکنش ژنی، توسط نرم افزار Cytoscape ترسیم شد که در آن، ژن‌ها در سه کلاستر مجزا دسته‌بندی شدند. کلاستر قرمز رنگ، شامل ژن‌هایی با تعداد اتصالات بالا، کلاستر آبی رنگ شامل ژن‌هایی با تعداد اتصالات متوسط و کلاستر سبز رنگ نیز شامل ژن‌هایی با تعداد اتصالات کم بودند. آنالیز enrichment برای کلیه کلاسترها با استفاده از پایگاه داده String صورت گرفت اما هیچ مسیر زیستی غنی شده‌ای، برای دسته‌های حاصل یافت نشد. با استفاده از آنالیز شبکه و محاسبه میزان اتصالات ژنی، ۷ ژن hub با بیشترین برهمکنش از بین تمامی برهمکنش‌های ژنی حاصل شد. بیشتر این ژن‌ها شامل فاکتورهای رونویسی و ژن‌هایی بودند که در مسیر پیام‌رسانی در سلول نقش داشتند که حاکی از اهمیت این مسیرها در مکانسیم تحمل به شوری در گیاه *S. salsa* می‌باشد که شامل MADS/AGL، RAV، AP2، GLR، CBL، DUF26 و MAPKK بودند.

ژن‌های *MADS-box* اجزای کلیدی شبکه‌های تنظیم‌کننده ژنی هستند که درپاسخ‌های گیاه به تنش‌های مختلف نقش دارند. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که افزایش بیان برخی از ژن‌های MADS-box موجب بهبود ظرفیت و کاهش نرخ از دست دادن آب شده و درجات مختلفی از تحمل را در گیاهان تراریخته ایجاد نمودند. در گوجه فرنگی نیز، بیان SIMBP11 (که یک ارتولوگ AGL15 است) توسط تنش شوری و خشکی القا و حذف آن، باعث حساس‌تر شدن لاین‌ها به تنش‌های مذکور شد (Zheng et al. 2023; Wang et al. 2023).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.1.5.3]



شکل ۲ -. شبکه ژنی ۵۰ ژن پاسخ دهنده به تنش شوری در گیاه ***Suaeda salsa***، کلاستر قرمز رنگ حاوی ژن‌هایی با تعداد برهمکنش های بالا، کلاستر آبی حاوی ژن‌هایی با برهکنش متوسط و کلاستر سبز رنگ شامل زن‌هایی با تعداد برهمکنش کم می‌باشند.

فاکتورهـای رونویسـی RAV، نقـش مهمـی در تنظیم پاسخ گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، از جمله پاتوژن‌ها و هورمون‌هـا، دارنـد. اعضـای خانواده RAV می‌توانند تحت تـأثیر هورمون‌هـای مختلف گیاهی قرار گیرند، اما نقش تنظیمی آن‌هـا بیشتر در پاسخ به اتیلن و براسینوستروئید می‌باشد. بطوری‌که در *Arabidopsis thaliana* بیان RAV1 با تیمـار اپی‌براسـینوئید کـاهش یافـت و گیاهـان تراریخته آرابیدوپسـیس کـه RAV1 را بـه میـزان بالایی بیـان می‌کردنـد، نسـبت بـه ABA حسـاس نبودند (Chen et al. 2021; karami et al. 2022). افزایش بیـان *TaRAV1*، تحمـل بـه شـوری را در آرابیدوپسـیس، بـه واسـطه تنظـیم بیـان ژن‌هـای رمزگذار SOS و دیگر ژن‌های دخیل، افزایش داد. یافته‌هـای لـو و همکـاران (۲۰۲۲) نشـان داد کـه TaRAV1 به عنوان یک فـاکتور رونویسـی عمـل می‌کند و با تنظیم بیـان ژن در مسـیر SOS، نقـش مهمـی را در سـازگاری بـا تـنش شـوری ایفـا می¬نماید.

فاکتورهـای رونویسـی خـانواده AP2/ERF از طریق مسیرهای سیگنالینگ وابسته و غیر وابسته به هورمون، در پاسخ به تنش‌هـای غیرزیسـتی نقـش دارند (Ma et al. 2024). مطالعات رونویسی نشان داده است که اکثر AP2/ERFها در شـرایط عـادی در سطوح پایینی بیان می‌شـوند، امـا تحـت تـاثیر

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.1.5.3]

هورمون‌ها و استرس‌های محیطی، القا یا سرکوب می‌شوند. علاوه بر این، بسیاری از AP2/ERF به هورمون‌های گیاهی از جمله اسید آبسیزیک اسید و اتیلن پاسخ می‌دهند تا به فعال‌سازی ژن‌های وابسته به تنش و وابسته به ABA و ET کمک کنند (Xie et al. 2019). هوانگ و همکاران (۲۰۲۲) ثابت کردند که بیان بیش از حد AP2/ERF19 در برنج باعث افزایش تحمل گیاه به تنش شوری می‌شود.

پروتئین‌های DUF مجموعه بزرگی از پروتئین‌ها با توالی آمینواسیدی حفاظت شده (دامنه) اما عملکردهای ناشناخته می‌باشند (Ma et al. 2024). پروتئین‌های حاوی دامنه DUF26 اکثراً پروتئین ساختاری خارج سلولی هستند که نقش مهمی را در انتقال سیگنال ایفا می‌کنند. CRK یک گیرنده کینازی غنی از سیستئین بوده و حاوی ساختار DUF26 در ناحیه خارج سلولی می‌باشد که یک زیر گروه بزرگ از پروتئین‌های کینازی را تشکیل می‌دهد و در پاسخ گیاه به استرس نقش دارد (hunter et al. 2019). بیان بیش از حد OsDUF6، موجب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و فنیل آلانین آمونیاک لیاز (که نقش مهمی را در مقابله با تنش‌های غیر زیستی دارند) می‌شود. علاوه بر این، آنالیز qRTPCR تأیید کرد که بیان بیش از حد OsDUF6 به طور قابل توجهی سطح بیان سایر ژن‌های مرتبط با رشد و تحمل به تنش را تغییر می‌دهد (Ma et al. 2024).

کانال‌های گیرنده گلوتامات گیاهی (GLR) نقش مهمی در رشد گیاه، پاسخ ایمنی، سیگنال‌دهی دفاعی و تولید اکسید نیتریک (NO) دارند. نقش مهم تولید اکسید نیتریک با واسطه GLR، حفاظت از بافت برگ در برابر تنش شوری می‌باشد. یافته‌های گوکسه و همکاران (۲۰۲۴) نشان داد که کاهش تجمع رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS)، افزایش فعالیت SOD و چرخه ASC-GSH که به واسطه چرخه تولید NO ایجاد می‌شوند، موجب حفظ عملکرد برگ در شرایط تنش شوری می‌گردد. این مکانیسم‌ها با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، به طور موثری به حفظ یکپارچگی غشاء در هنگام تنش کمک می‌کنند. با این حال، نقش عملکردی این ژن در تنش‌های محیطی، به ویژه در تنظیم رادیکال‌های فعال اکسیژن، هنوز به طور کامل درک نشده است (Sun et al. 2024).

در گیاهان، پروتئین‌های شبه کلسی‌نورین CBL با یک گروه خاص از پروتئین‌های کینازی بنام پروتئین‌های کینازی برهم‌کنش کننده با CBL (CIPKs) برهم‌کنش دارند و فعالیت آن‌ها را تنظیم می‌کنند (Cheong et al. 2003; Imtiaz et al. 2023). در هنگام تنش، CBLها به عنوان گیرنده‌های منحصر به فرد یون کلسیم عمل کرده

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.1.5.3]

و به CIPKها متصل می‌شوند و یک کمپلکس فعال CBL-CIPK، برای فسفوریلاسیون پروتئین‌های پایین دست را ایجاد می‌کنند تا توانایی پاسخ به استرس را در گیاهان بهبود ببخشند (Xiaolin et al. 2022). سیگنال دهی CBL-CIPK در گیاهان آرابیدوپسیس، پنبه و برنج به عنوان یک سیستم وابسته به یون کلسیم شناخته شده است که تحمل به تنش‌های غیرزیستی را تسهیل می‌کند و همچنین در رشد و نمو گیاهان نقش دارد. اخیرا، افزایش بیان CBL-CIPK در *A. thaliana* و *O. sativa* افزایش تحمل به شوری را در این گیاهان تأیید می‌کند (Cheong et al. 2003; Aslam et al. 2022; Imtiaz et al. 2023).

پروتئین کینازهای فعال شده با میتوژن (MAPKs) مبدل‌های پیام‌رسان درون سلولی هستند که محرک‌های خارج سلولی را از طریق سه لایه پروتئین کینازی، شامل MAPK کیناز کینازها (MAPKKKs)، MAPK کینازها (MAPKKs و MAPKs) به سلول‌های گیاهی منتقل می‌کنند. هنگامی که گیاهان به محرک ها پاسخ می‌دهند، MAPKKK ها فسفریله می‌شوند و بنابراین MAPKK ها را فعال می‌کنند که به نوبه خود MAPK ها را فسفریله می‌کنند. MAPKهای فسفریله شده از سیتوپلاسم به هسته منتقل می‌شوند و بیان ژن‌ها را تنظیم و در نتیجه رشد و نمو گیاهان را تعدیل می‌کنند. در طی تنش‌های اسمزی نیز MAPKها با انتقال پیام به عوامل خاص، نقش کلیدی را برای زنده ماندن سلول تحت غلظت بالای شوری ایفا می‌کنند (Yin et al. 2017; Wie et al. 2022).

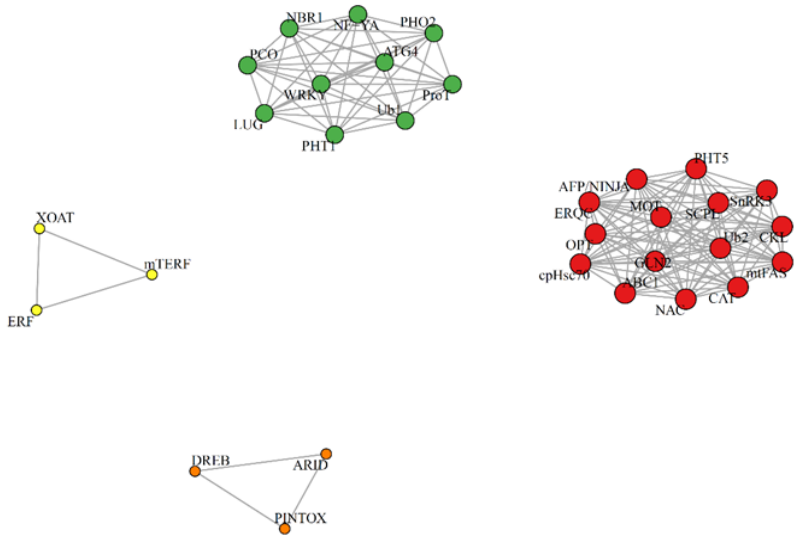
ماژول‌ها یا زیرشبکه‌های ژنی

زیرشبکه‌های ژنی یا ماژول‌ها، با تعداد زیاد اتصالات درون گروهی و اتصالات بسیار کم با سایر ژن‌ها در شبکه شناخته می‌شوند و نشان دهنده شکل‌گیری ابعاد و مسیرهای بیولوژیک مستقل می باشند (Cohen and Havlin, 2010). برای رسم ماژول‌ها از آستانه $r>0.95$ و P-value<0.01 و نرم افزار cytoscape استفاده شد. از ۵۰ ژنی که برای ترسیم شبکه انتخاب شدند ۳۱ ژن، در ۴ ماژول قرار گرفتند که بیشترین تعداد ژن مربوط به ماژول قرمز رنگ (۱۵ ژن) و کم‌ترین تعداد مربوط به ماژول زرد و نارنجی (۳ ژن) بود. آنالیز enrichment برای کلیه ماژول‌ها با استفاده از پایگاه داده String صورت گرفت. متابولیسم گلی‌اگزالات و دی کربوکسیلات تنها مسیر غنی شده‌ای بود که در ماژول قرمز رنگ یافت شد. ماژول سبز رنگ شامل فاکتورهای رونویسی و ژن‌هایی بودند که در مسیر هموستازی پروتئینی نقش داشتند اما از آنجایی که اکثر ژن‌های این ماژول در دیتابیس‌های موجود هنوز ناشناخته می‌باشند غنی‌سازی این ژن‌ها معنی دار نبود.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.1.5.3]

چرخه گلی‌اگزالات و دی کربوکسیلات با حفظ تعادل متابولیکی به عنوان یک مسیر کلیدی در تنش‌های غیرزیستی محسوب می‌شود (Neto et al. 2021). در شرایط تنش، این چرخه به طور موثری جایگزین چرخه اسید سیتریک (چرخه TCA) در بافت‌های خاص می‌شود و به گیاهان اجازه می‌دهد تا کربوهیدرات‌ها را از ترکیبات دو کربنه مانند اسیدهای چرب یا استیل کوآ سنتز کنند و به حفظ انرژی و تعادل کربنی در شرایط تنش که فتوسنتز محدود است کمک می‌کند (Li et al. 2023; Yin et al. 2024). متابولیسم گلی اگزالات و دی کربوکسیلات با ارائه واسطه‌های متابولیکی (که می‌توانند وارد مسیرهای دیگر شوند) و تجمع متابولیک‌ها به حفظ تعادل اسمزی گیاه در شرایط تنش کمک می‌کند. در واقع، فعال شدن این مسیر می‌تواند منجر به تولید متابولیت‌هایی شود که تثبیت عملکرد سلولی و رشد را شرایط تنش به همراه دارد (Zhang et al. 2019; Neto et al. 2021). از سوی دیگر، تنظیم مثبت چرخه گلی‌اگزالات، ژن‌های کلیدی و آنزیم‌های مرتبط با آنتی‌اکسیدان‌ها را فعال می‌کند و به سلول‌ها این امکان را می‌دهد تا ظرفیت آنتی‌اکسیدانی خود را افزایش داده و ROS را از بین ببرند. بنابراین به گیاهان کمک می‌کند تا با محیط سازگار شوند و در برابر تنش‌های محیطی مقاومت کنند (Zeng et al. 2022).



شکل – زیرشبکه‌های ژنی یا ماژول‌ها، برای رسم ماژول‌ها از آستانه $r>0.95$ و $P\text{-value}<0.01$ استفاده شد. از ۵۰ ژنی که برای ترسیم شبکه انتخاب شدند ۳۱ ژن آن در ۴ ماژول متفاوت قرار گرفتند.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.1.5.3]

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، تجزیه و تحلیل شبکه همبستگی بر روی ۵۰ ژن پاسخ دهنده به شوری صورت گرفت تا ژن‌های کلیدی درگیر و نحوه ارتباط بین آن‌ها را در گیاه *S. salsa* تحت تنش شوری شناسایی کنیم. آنالیز هستی‌شناسی ژن‌ها نشان داد که در گیاه *S. salsa* مسیرهای تنظیمی در سطح سلول و در سطح DNA مسیرهای مهم درگیر در استرس شوری می باشند. تحت استرس شوری، بسیاری از پروتئین‌های ساختاری و غشایی در معرض تغییرات ساختاری قرار می گیرند، بنابراین حفظ عملکرد آن‌ها برای بقای سلول در شرایط استرس حیاتی است. با استفاده از آنالیز شبکه و محاسبه میزان اتصالات ژنی، ۷ ژن (hub) با بیشترین برهمکنش از بین تمامی برهمکنش های ژنی حاصل شد. بیشتر این ژن،ها شامل فاکتورهای رونویسی و ژن‌هایی بودند که در مسیر پیام‌رسانی در سلول نقش داشتند، که حاکی از اهمیت آن‌ها در مکانسیم تحمل به شوری در این گیاه است. در آنالیز enrichment برای کلیه ماژول‌ها، مسیر متابولیسم گلی‌اگزالات و دی کربوکسیلات تنها مسیر غنی شده حاصل در ماژول قرمز رنگ بود که آنزیم‌های مرتبط با آنتی‌اکسیدآن‌ها و ژن‌های کلیدی را فعال می‌کند و به سلول‌ها کمک می‌کند تا ROS را در طول تنش‌های شوری از بین ببرند. این یافته‌ها ممکن است نویدبخش به روز رسانی دانش ما در مورد نقش ژن‌های دخیل در تحمل به شوری باشد و می‌تواند برای کشت گیاهآن‌هالوفیتی مانند *S salsa* با استفاده از منابع آبی غیر متعارف نیز مفید واقع شود.

تشکر و قدردانی

از موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، بخش زیست‌شناسی سامانه¬ها جهت فراهم آوردن امکانات لازم در راستای این حقیق تشکر و قدردانی می¬شود.

فهرست منابع

References

Abdellaoui R, Elkelish A, El-Keblawy A, Mighri H, Boughalleb F, Bakhshandeh E. 2023. Halophytes: salt stress tolerance mechanisms and potential use. Frontiers in Plant Science. 14: 1218184. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1218184.

Aslam M, Greaves JG, Jakada BH, Fakher B, Wang X, Qin Y. 2022. AcCIPK5, a pineapple CBL-interacting protein kinase, confers salt, osmotic and cold stress tolerance in transgenic Arabidopsis. Plant Science. 320: 111284. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111284.

Banik S, Dutta D. 2023. Membrane proteins in plant salinity stress perception, sensing, and response. The Journal of Membrane Biology. 256(2): 109–124. https://doi.org/10.1007/s00232-023-00279-9.

Bano N, Fakhrah S, Mohanty CS, Bag SK. 2022. Transcriptome meta-analysis associated targeting hub genes and pathways of drought and salt stress responses in cotton (*Gossypium hirsutum*): A network

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.1.5.3]

biology approach. Frontiers in Plant Science. 13: 818472. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.818472.

Chen C, Li Y, Zhang H, Ma Q, Wei Z, Chen J, Sun Z. 2021. Genome-wide analysis of the RAV transcription factor genes in rice reveals their response patterns to hormones and virus infection. Viruses. 13(5): 752. https://doi.org/10.3390/v13050752.

Cheong YH., Kim KN, Pandey GK, Gupta R, Grant JJ, Luan S. 2003. CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in arabidopsis. The Plant Cell. 15(8): 1833–1845. https://doi.org/10.1105/tpc.012393.

Cohen R, Havlin S. 2010. Complex networks: Structure, robustness and function. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Farhadian M, Rafat SA, Panahi B, Mayack C. 2021. Weighted gene co-expression network analysis identifies modules and functionally enriched pathways in the lactation process. Scientific Reports. 11(1): 2367. https://doi.org/10.1038/s41598-021-81888-z.

Gokce A, Sekmen Cetinel AH, Turkan I. 2024. Involvement of GLR-mediated nitric oxide effects on ROS metabolism in Arabidopsis plants under salt stress. Journal of Plant Research. 137(3): 485–503. https://doi.org/10.1007/s10265-024-01528-1.

Grennan KS, Chen C, Gershon ES, Liu C. 2014. Molecular network analysis enhances understanding of the biology of mental disorders. BioEssays. 36(6): 606–616. https://doi.org/10.1002/bies.201300147.

Grigore MN, Vicente O. 2023. Wild halophytes: tools for understanding salt tolerance mechanisms of plants and for adapting agriculture to climate change. Plants. 12(2): 221. https://doi.org/10.3390/plants12020221.

Guo J, Song J, Wang B. 2021. Adaptation of the euhalophyte *Suaeda salsa* to high-salinity conditions. In: Grigore MN (Ed.) Handbook of Halophytes. Springer, Switzerland. 1971-1990. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57635-6_83.

Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, Couger MB, Eccles D, Li B, Lieber M, MacManes MD, Ott M, Orvis J, Pochet N, Strozzi F, Weeks N, Westerman R, William T, Dewey CN, Henschel R, LeDuk RD, Friedman N, 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.

Hernández JA. 2019. Salinity tolerance in plants: trends and perspectives. International Journal of Molecular Sciences. 20(10): 2408. https://doi.org/10.3390/ijms20102408.

Hosseini SS, Ramezanpour SS, Soltanloo H, Seifati SE. 2023. RNA-seq analysis and reconstruction of gene networks involved in response to salinity stress in quinoa (cv. Titicaca). Scientific Reports. 13(1): 7308. https://doi.org/10.1038/s41598-023-34534-9.

Huang Y, Liu L, Hu H, Tang N, Shi L, Xu F, Wang S. 2022. Arabidopsis ERF012 is a versatile regulator of plant growth, development and abiotic stress responses. International Journal of Molecular Sciences. 23(12): 6841. https://doi.org/10.3390/ijms23126841.

Hunter K, Kimura S, Rokka A, Tran HC, Toyota M, Kukkonen JP, Wrzaczek M. 2019. CRK2 enhances salt tolerance by regulating callose deposition in connection with PLDα1. Plant Physiology. 180: 2004–2021. https://doi.org/10.1104/pp.19.00560.

Imtiaz K, Ahmed M, Annum N, Tester M, Saeed NA. 2023. AtCIPK16, a CBL-interacting protein kinase gene, confers salinity tolerance in transgenic wheat. Frontiers in Plant Science. 14: 1127311. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1127311.

Jamalirad S, Azimi MR, Khoshkholgh Sima NA, Zeinalabedini M, Karimi Farsad L, Hosseini Salekdeh G, Ghaffari MR. 2023. Comprehensive transcriptional analysis unveils salt stress-regulated key pathways in *Suaeda salsa* leaves. Plant Gene. 36: 100436. https://doi.org/10.1016/j.plgene.2023.100433.

Karami M, Fatahi N, Lohrasebi T, Razavi K. 2022. RAV transcription factor regulatory function in response to salt stress in two Iranian wheat landraces. Journal of Plant Research. 135(1): 121–136.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.1.5.3]

https://doi.org/10.1007/s10265-021-01356-7.

Kleyer M, Trinogga J, Cebrián-Piqueras MA, Trenkamp A, Flojgaard C, Ejrnaes R, Bouma TJ, Minden V, Maier M, Mantilla-Contreras J, Albach DC, Blasius B. 2019. Trait correlation network analysis identifies biomass allocation traits and stem specific length as hub traits in herbaceous perennial plants. Journal of Ecology. 107: 829–842. https://doi.org/10.1111/1365-2745.13066.

Li B, Dewey CN. 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics. 12: 323. https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323.

Li J, Liu M. 2019. Biological features and regulatory mechanisms of salt tolerance in plants. Journal of Cellular Biochemistry. 120(7): 10914–10920. https://doi.org/10.1002/jcb.28474.

Li L, Wang J, Qian C, Zhang C, Wang H, Li W, Zhao H, Ju Y. 2023. Physiological and molecular responses of apocynum venetum L. (Apocynaceae) on salt stress. Horticulturae. 9(9): 1010. https://doi.org/10.3390/horticulturae9091010.

Li C, Chen L, Fan Q, He P, Wang C, Huang H, Huang R, Tang J, Tadda SA, Qiu D, Qiu Z. 2023. Weighted gene co-expression network analysis to explore hub genes of resveratrol biosynthesis in exocarp and mesocarp of 'summer black' grape. Plants. 12(3): 578. https://doi.org/10.3390/plants12030578.

Ling Z, Zhike Z, Shuanquan L, Tingting Z, Xiangchui Y. 2013. Evaluation of six methods for extraction of total RNA from loquat. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 41(1): 313–316. https://doi.org/10.15835/nbha4118233.

Luo YX, Chen SK, Wang PD, Peng D, Zhang X, Li HF, Feng CZ. 2022. Genome-wide analysis of the RAV gene family in wheat and functional identification of TaRAV1 in salt stress. International Journal of Molecular Sciences. 23(16): 8834. https://doi.org/10.3390/ijms23168834.

Ma G, Zhang Y, Li X. 2024. Overexpression of *OsDUF6* increases salt stress tolerance in rice. BMC Plant Biology. 24: 216. https://doi.org/10.1186/s12870-024-04921-z.

Meng X, Zhou J, Sui N. 2018. Mechanisms of salt tolerance in halophytes: current understanding and recent advances. Open Life Sciences. 13: 149–154. https://doi.org/10.1515/biol-2018-0020.

Neto JCR, Vieira LR, de Aquino Ribeiro JA, de Sousa CAF, Júnior MTS, Abdelnur PV. 2021. Metabolic effect of drought stress on the leaves of young oil palm (*Elaeis guineensis*) plants using UHPLC-MS and multivariate analysis. Scientific Reports. 11(1): 18271. https://doi.org/10.1038/s41598-021-97835-x.

Proulx SR, Promislow DEL, Phillips PC. 2005. Network thinking in ecology and evolution. Trends in Ecology & Evolution. 20: 345–353. https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.04.004.

Rahman MM, Mostofa MG, Keya SS, Siddiqui MN, Ansary MMU, Das AK, Rahman MA, Tran LS. 2021. Adaptive mechanisms of halophytes and their potential in improving salinity tolerance in plants. International Journal of Molecular Sciences. 22(19): 10733. https://doi.org/10.3390/ijms221910733.

Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva EV, Zdobnov EM. 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. Bioinformatics. 31(19): 3210–3212. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351.

Song J, Wang B. 2015. Using euhalophytes to understand salt tolerance and to develop saline agriculture: *Suaeda salsa* as a promising model. Annals of Botany. 115(3): 541–553. https://doi.org/10.1093/aob/mcu194.

Sun H, Liu R, Qi Y, Gao H, Wang X, Jiang N, Guo X, Zhang H, YU C. 2024. Genome-wide exploration of the grape glr gene family and differential responses of vvglr3.1 and vvglr3.2 to low temperature and salt stress. Phyton. 93(3): 533-549.

Toubiana D, Sade N, Liu L, Wilhelmi M, Brotman Y, Luzarowska U, Vogel J, Blumwald E. 2020. Correlation-based network analysis combined with machine learning techniques highlight the role of the GABA shunt in Brachypodium sylvaticum freezing tolerance. Scientific Reports. 10: 4489.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.1.5.3]

https://doi.org/10.1038/s41598-020-61081-4.

Wang F, Zhou Z, Zhu L, Gu Y, Guo B, Lv C, Zhu J, Xu R. 2023. Genome-wide analysis of the MADS-box gene family involved in salt and waterlogging tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). Frontiers in Plant Science. 14: 1178065. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1178065.

Wang Z, Liu K. 2024. Effect of intertidal vegetation (*Suaeda salsa*) restoration on microbial diversity in the offshore areas of the yellow river delta. Plants. 13(2): 213. https://doi.org/10.3390/plants13020213.

Wei L, Feng L, Liu Y, Liao W. 2022. Mitogen-activated protein kinase is involved in salt stress response in tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings. International Journal of Molecular Sciences. 23(14): 7645. https://doi.org/10.3390/ijms23147645.

Xiaolin Z, Baoqiang W, Xian W, Xiaohong W. 2022. Identification of the CIPK-CBL family gene and functional characterization of CqCIPK14 gene under drought stress in quinoa. BMC Genomics. 23: 447. https://doi.org/10.1186/s12864-022-08683-6.

Xie Z, Nolan TM, Jiang H, Yin Y. 2019. AP2/ERF transcription factor regulatory networks in hormone and abiotic stress responses in Arabidopsis. Frontiers in Plant Science. 10: 228. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00228.

Yi G, Sze SH, Michael R. 2007. Identifying clusters of functionally related genes in genomes. Bioinformatics. 23: 1053–1060. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl673.

Yin W, Hu Z, Hu J, Zhu Z, Yu X, Cui B, Chen G. 2017. Tomato (*Solanum lycopersicum*) MADS-box transcription factor SlMBP8 regulates drought, salt tolerance and stress-related genes. Plant Growth Regulation. 83: 1-14. https://doi.org/10.1007/s10725-017-0283-2.

Yin R, Chen L, Deng P, Cao X, Xu X. 2024. Characterization of changes in active ingredients and mining of key metabolites in bletilla striata under shading and drought stresses. Horticulturae. 10(2): https://doi.org/10.3390/horticulturae10020163.

Zainal-Abidin RA, Harun S, Vengatharajuloo V, Tamizi AA, Samsulrizal NH. 2022. Gene co-expression network tools and databases for crop improvement. Plants. 11(13): 1625. https://doi.org/10.3390/plants11131625.

Zeng N, Zhang N, Ma X, Wang Y, Zhang Y, Wang D, Pu F, Li B. 2022. Transcriptomics integrated with metabolomics: assessing the central metabolism of different cells after cell differentiation in Aureobasidium pullulans NG. Journal of Fungi. 8(8): 882. https://doi.org/10.3390/jof8080882.

Zhang Y, Li D, Zhou R, Wang X, Dossa K, Wang L, Zhang Y, Yu J, Gong H, Zhang X, You J. 2019. Transcriptome and metabolome analyses of two contrasting sesame genotypes reveal the crucial biological pathways involved in rapid adaptive response to salt stress. BMC Plant Biology. 19(66). https://doi.org/10.1186/s12870-019-1665-6.

Zheng B, Wang S, Wu H, Ma X, Xu W, Xie K, Shangguan L, Fang J. 2023. Genome-wide identification of mango (*Mangifera indica* L.) MADS-Box genes related to fruit ripening. Horticulturae. 9(12): 1289. https://doi.org/10.3390/horticulturae9121289.

Correlation Network Analysis of Genes Responding to Salinity Stress in *Suaeda salsa*

Shima Jamalirad[1], Mohammad Reza Azimi[2], Mohammad Reza Ghaffari[3*]

1- Former Ph.D. student, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran

2- Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.1.5.3]

3- Associate Professor, Department of System Biology, Agricultural Biotechnology Research of Iran (ABRII), Karaj, Iran
mrghaffari52@gmail.com

Abstract

Salinity stress is a significant abiotic factor causing substantial reductions in agricultural crop yields, particularly in arid and semi-arid regions. To identify key genes associated with salinity tolerance, Suaeda salsa, a species known for its ability to thrive in high-salinity environments, was studied at the transcriptome level. RNA sequencing was conducted under NaCl concentrations of 0, 200, 400, and 800 mM to profile gene expression during salinity stress. While these studies often emphasize differentially expressed genes, the interaction dynamics among genes under salinity stress remain underexplored. To address this, a correlation network was constructed for 50 selected genes (logFC>2, salinity vs. control) with 848 interactions, grouped into three clusters. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis revealed that glyoxylate and dicarboxylate metabolism was the sole enriched pathway during salinity stress.

Keywords: RNA sequencing, Abiotic stress, Halophyte

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.1.5.3]