

مطالعه ارتباط ژن *TSA1* با مسیر بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها "ترکیبات ثانویه سولفوردار گیاهان خانواده کلم"

امید جزایری^۱، طاهره‌السادات آقاجانزاده^{۲*}، تنو الزنگا^۳

۱. استادیار گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۲. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۳. استاد گروه فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی و مهندسی، دانشگاه گرونینگن، گرونینگن، هلند

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۱۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۱۱/۲۵)

Relation between *TSA1* gene and biosynthesis of glucosinolates "secondary sulfur compounds in Brassicaceae family"

Omid Jazayeri¹, Tahereh A. Aghajanzadeh^{2*}, Theo Elzenga³

1. Assistant Professor, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

3. Professor, Laboratory of Plant Physiology, Faculty of Science and Engineering, University of Groningen, Groningen, the Netherlands.

(Received: Aug. 5, 2017 - Accepted: Feb. 14, 2018)

Abstract

Glucosinolates are a potential target for genetic manipulation in crop improvement programs, due to their diverse roles in animal nutrition, plant defense against pests and pathogens, beneficial treatment effects in cancer, cardiovascular and neurological diseases. To date, more than 30 genes which are involved in biosynthesis of glucosinolates have been identified in *Arabidopsis thaliana*. During biotic and abiotic stresses, glucosinolate biosynthesis is further controlled by a complex network of transcription factors. Receptor-like kinases (RLKs) are proteins which act as cell surface receptors perceiving developmental and environmental signals in plants. Following functional studies of a RLKs (*AT2G37050*) in *Arabidopsis thaliana*, our previous proteomic data showed that 22 proteins such as *TSA1*, *AT3G47570* and *AT1G08750* were appeared in knockout of *AT2G37050* while these proteins were not detected in wild type plant (unpublished data). The analysis resulted from GeneMANIA algorithm revealed biological connections between these three genes and glucosinolate biosynthesis pathway genes as well as regulating genes of glucosinolate biosynthesis pathway. Since glucosinolates are considered as sulfur containing secondary compounds in *Arabidopsis thaliana* and Brassicaceae family, biological connections between *TSA1* and *AT3G47570* with sulfur transporter genes as well as sulfur assimilation pathway genes will support more the role of these two genes on regulation of glucosinolates biosynthesis pathway.

Keywords: Brassica, Glucosinolate biosynthesis, *TSA1* gene.

چکیده

اهمیت تغذیه‌ای گلوکوزینولات‌ها در انسان‌ها، حیوانات و اثرات آنها در بهبود سرطان، بیماری‌های قلبی-عروقی، عصبی و نقش دفاعی آنها در گیاهان علیه آفت‌ها و پاتوژن‌ها موجب گردیده است تا مسیر بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها گزینه مناسبی جهت مطالعات ژنتیکی قرار گیرند. در شرایط تنشی، بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها به وسیله مجموعه‌ای از فاکتورهای رونویسی تحت کنترل مثبت یا منفی قرار می‌گیرند. شبه‌رستورهای کینازی در واقع پروتئین‌هایی هستند که به عنوان گیرنده‌های سطحی سلول، پیام‌های محیطی را دریافت می‌کنند. هدف از تحقیق حاضر مطالعه نقش تنظیمی ژن *AT2G37050* در ارتباط با بیوسنتز گلیکوزینولات‌ها می‌باشد. به دنبال مطالعات پروتئومیک قبلی انجام شده بر روی گیاه آرابیدوپسیس تالیانا، جهش یافته که ژن شبه رستور کینازی *AT2G37050* آن از کار افتاده، مشخص گردید که ۲۲ پروتئین در گیاه جهش یافته وجود دارند در حالی که در گیاه نوع وحشی (کنترل) حضور ندارند. مطالعات بیوانفورماتیکی حاضر، برگرفته از منابع مستخرج از الگوریتم GeneMANIA به کمک نرم‌افزار Cytoscape نشان داده است که بین سه پروتئین TSK-associating protein1 (*TSA1*)، *AT3G47570* و *AT1G08750* با پروتئین‌های درگیر در بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها و همچنین تنظیم‌کننده‌های بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها ارتباطات بیولوژیکی از نوع هم‌بیانی ژنی، برهم‌کنش پروتئین-پروتئین و قرارگیری در یک مکان مشترک درون سلولی (هم‌مکانی) وجود دارد. از طرفی دیگر، با توجه به اینکه گلوکوزینولات‌ها به عنوان ترکیبات ثانویه سولفوردار در آرابیدوپسیس تالیانا و گیاهان خانواده کلم شناخته شده‌اند، وجود ارتباط زیستی بین ژن *TSA1* و *AT3G47570* با ژن‌ها/ پروتئین‌های ناقل سولفور و مسیر احیای سولفور، بر نقش این دو ژن در ارتباط با بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها قوت بیشتری بخشیده است.

واژه‌های کلیدی: بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها، ژن *TSA1*، کلم.

مقدمه

گلوکوزینولات‌ها شامل یک گروه بزرگ از متابولیت‌های ثانویه سولفوردار هستند که در همه گیاهان خانواده کلم و گیاه مدل آرابیدوپسیس تالیانا یافت می‌شود (Halkier & Gershenzon, 2006; Tripathi & Mishra, 2007). بر اساس اسیدهای آمینه پیش‌ساز، گلوکوزینولات‌ها به گروه‌های بزرگ با نام‌های خطی (آلیفاتیک) و حلقوی (ایندولیک و آروماتیک) تقسیم‌بندی می‌شوند (Halkier & Gershenzon, 2006). گلوکوزینولات‌ها مسئول افزایش ارزش غذایی مانند کیفیت، بو و طعم فرآورده‌های غذایی کلم در بخش‌های خوراکی آن مانند برگ (*Brassica rapa*)، ساقه (*B. oleraceae*)، گل (*B. oleraceae*)، ریشه (*B. rapa*) و دانه روغنی (*B. napus*) می‌باشد (Martinez-Sánchez et al., 2006; Padilla et al., 2007). همچنین در سال‌های اخیر گلوکوزینولات‌ها و محصولات ناشی از تجزیه آنها به دلیل نقش مؤثر در سلامت انسان‌ها و گیاهان توجه قابل ملاحظه‌ای را به خود جلب کرده‌اند (Halkier & Gershenzon, 2006). علاوه بر نقش دفاعی آنها در گیاهان علیه آفت‌ها و پاتوژن‌ها، برخی از گلوکوزینولات‌ها و محصولات ناشی از تجزیه آنها در بهبود سرطان، بیماری‌های قلبی-عروقی و عصبی نقش مهمی ایفا می‌کنند (Halkier & Gershenzon, 2006; Traka & Mithen, 2009; Dinkova-Kostova & Kostov, 2012). تاکنون تعداد زیادی ژن درگیر در بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها شناسائی شده است. ژن‌های *BAT5*، *BCAT4*، *BCAT3*، *MAM1*، *MAM3*، *ATIMD3* و *APO2* بیوسنتز آلیفاتیک گلوکوزینولات‌ها را با طول کردن و تغییرات ثانویه زنجیرهای جانبی متیونین (اسید آمینه پیش‌ساز آلیفاتیک گلوکوزینولات‌ها) شروع می‌کنند. سپس بیوسنتز هسته مرکزی آلیفاتیک گلوکوزینولات‌ها به وسیله سیتوکروم مونواکسیژناز P450 از قبیل

CYP79F1، *CYP79F2* و *CYP83A1* و همچنین سایر ژن‌ها با نام‌های *GSTU20*، *GSTF11*، *AOP3* و *AOP1* انجام می‌شود. به همین ترتیب آنزیم‌های *CYP79B2*، *CYP79B3*، *CYP83B1*، *CYP79A2*، *CYP81F2*، *GSTF9*، *GSTF10* و *UGT74B1* درگیر در بیوسنتز هسته مرکزی ایندولیک و آروماتیک گلوکوزینولات‌ها می‌باشند (Mikkelsen et al., 2000; Chen et al., 2003; Naur et al., 2003). ضمناً آنزیم C-S لیاز (SUR1) (Hull et al., 2000; Mikkelsen et al., 2000)، آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز (*UGT74B1*) و سولفو ترانسفراز (*SOT16*، *SOT17*، *SOT18*) (Petersen et al., 2001)، *AAO4*، *APK1A*، *CHY1* و *GSH1* در بیوسنتز هر دو نوع گلوکوزینولات (خطی و حلقوی) دخالت دارند (Sønderby et al., 2010). مقدار و ترکیب (انواع) گلوکوزینولات‌ها در اندام‌ها و بافت‌های گیاهی، در طی مراحل تکاملی مختلف و همچنین در پاسخ به تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده تغییر می‌کنند (Brown et al., 2003; Petersen et al., 2002). چندین پروتئین هسته‌ای که متابولیسم گلوکوزینولات‌ها را در شرایط محیطی مختلف تنظیم می‌کنند، شناخته شده‌اند. *IQD1* (پروتئین هسته‌ای باند شده به کلسیم) در مقاومت گیاه به حشرات و گیاه خواران از طریق تحریک تولید گلوکوزینولات‌ها نقش مهمی دارد (Levy et al., 2005). از دیگر تنظیم‌کننده‌ها می‌توان به *SLIM1* اشاره کرد که ممانعت‌کننده بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها و فعال‌کننده آنزیم‌های تجزیه‌کننده گلوکوزینولات‌ها در پاسخ به کمبود سولفور می‌باشد (Maruyama-Nakashita et al., 2006). علاوه بر این، *Dof1.1* تنظیم‌کننده مثبت بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها می‌باشد که در پاسخ به حمله پاتوژن‌ها فعال می‌گردد (Skirycz et al., 2006). *ATR1* نیز به‌عنوان فعال‌کننده آنزیم‌های مسئول بیوسنتز ایندولیک گلوکوزینولات‌ها و همچنین تنظیم

آزمایشگاه، تحقیق در مورد عملکرد ژن‌ها را تسهیل بخشیده است (Jazayeri, 2016). مطالعه بیوانفورماتیک با استفاده از الگوریتم GeneMANIA و گیاه مدل آرآیدوپسیس تالیانا انجام شد. الگوریتم GeneMANIA (Zuberi et al., 2013) با استفاده از داده‌های مختلف زیستی شامل پیش‌بینی برهم‌کنش پروتئین-پروتئین (مستخرج از ۲۳ مقاله)، برهم‌کنش ژن-ژن (مستخرج از پایگاه BioGrid)، وجود دُمین پروتئینی مشترک (مستخرج از پایگاه InterPro و Pfam)، هم‌مکانی دو پروتئین در درون یک اندامک یکسان (یک مقاله دربرگیرنده اطلاعات ۸۳۱۱۰۹ هم‌مکانی) و هم‌زمانی بیان دو ژن (مستخرج از ۲۶۸ مقاله) قادر به شناسایی ارتباطات زیستی بین ژن‌ها/پروتئین‌ها و طرح فرضیه/پیش‌بینی در خصوص عملکرد ژن‌ها می‌باشد. جهت به تصویر کشیدن ارتباطات زیستی بین ژن‌ها/پروتئین‌ها از الگوریتم GeneMANIA و نرم‌افزار Cytoscape version 3.4.0 استفاده شد. مطالعات پروتئومیک قبلی انجام‌شده به منظور بررسی نقش عملکردی ژن *AT2G37050* (رسپتور شبه کینازی) در گیاه آرآیدوپسیس تالیانا، نشان داد ۲۲ پروتئین در گیاه جهش‌یافته که ژن *AT2G37050* آن از کار افتاده (knockout) ظاهر شده‌اند، در حالی که این پروتئین‌ها در گیاه وحشی یافت نشده بود (شکل ۱).

در مطالعه حاضر ۳۲ ژن/پروتئین مسیر بیوستنر گلوکوزینولات‌ها، ۱۲ ژن/پروتئین تنظیم‌کننده مسیر بیوستنر گلوکوزینولات‌ها به همراه ۲۲ پروتئین ظاهرشده در گیاه آرآیدوپسیس تالیانا که در آن ژن *AT2G37050* از کار افتاده بود به عنوان ورودی اولیه الگوریتم GeneMANIA استفاده شد (جدول ۱).

از آنجایی که مسیر بیوستنر گلوکوزینولات‌ها دارای دو یا سه نوع ارتباط یا لینک با مسیر احیای سولفور بر اساس نوع گلوکوزینولات‌ها است بنابراین درتأیید ارتباط احتمالی زیستی بین سه ژن کاندید *TSA1*، *AT3G47570* و *AT1G08750* با مسیر بیوستنر

کننده هموستازی بین بیوستنر ایندولیک گلوکوزینولات‌ها و هورمون اکسین شناخته شده است (Celenza et al., 2005). چندین فاکتور رونویسی متعلق به خانواده R2R3-MYB موجب تنظیم مثبت بیوستنر گلوکوزینولات‌ها در پاسخ به تغییرات محیطی می‌شوند. فاکتورهای رونویسی MYB28، MYB29، MYB76 و بیوستنر آلیفاتیک گلوکوزینولات‌ها و فاکتورهای رونویسی MYB34، MYB51 و MYB122 بیوستنر ایندولیک و آروماتیک گلوکوزینولات‌ها را تنظیم می‌کنند (Celenza et al., 2005; Gigolashvili et al., 2007; Gigolashvili et al., 2007; Hirai et al., 2007). در سال‌های اخیر، به دلیل اطلاعات ناکافی در مورد مکانیزم‌های تنظیمی بیوستنر گلوکوزینولات‌ها، این موضوع بیشتر مورد هدف محققان قرار گرفته است. شبه رسپتورهای کینازی که یک گروه بزرگ ژنی را تشکیل می‌دهند، دارای نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های محیطی به‌ویژه تنش‌های زنده می‌باشند. به دنبال مطالعات انجام شده بر روی ژن شبه رسپتورکینازی با نام *AT2G37050* در گیاه آرآیدوپسیس تالیانا و همچنین داده‌های پروتئومیکس (داده‌ها منتشر نشده است) مشخص گردیده است که ۲۲ پروتئین از جمله TSK-associating (TSA1) protein1 در گیاه جهش‌یافته وجود دارد که در گیاه نوع وحشی (کنترل) حضور ندارد. هدف از انجام این پژوهش بررسی نقش و ارتباط احتمالی ژن *AT2G37050* با ژن‌های مسیر بیوستنر گلوکوزینولات‌ها به کمک اطلاعات بیوانفورماتیکی و داده‌های پروتئومیکس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه بیوانفورماتیک با به کارگیری داده‌های موجود در بانک‌های اطلاعات زیستی، نگرش مهمی در ارتباطات زیستی بین ژن‌ها و پروتئین‌ها فراهم نموده و با جهت دهی و طراحی مناسب آزمایش‌ها در درون

اندامک سلولی یکسان نشان داده شده است (شکل ۲). نتایج نشان می‌دهد که به جز چهار پروتئین TIR، AT5G54710، F316.9 و AAO4 سایر پروتئین‌ها در این شبکه زیستی قرار گرفته و حداقل توسط یکی از ارتباطات زیستی مذکور با یکدیگر مرتبط شده‌اند. در این شبکه زیستی ۶۷ پروتئین توسط ۴۶۷ ارتباط زیستی به یکدیگر متصل شده‌اند (شکل ۲). حدود ۸۹٪ از ارتباطات زیستی از نوع هم بیانی دو ژن، ۷/۵٪ از نوع پیش بینی برهم کنش پروتئین-پروتئین، ۲٪ بر اساس وجود دُمین پروتئینی مشترک و ۱/۲٪ بر اساس هم مکانی دو پروتئین در درون یک اندامک یکسان بوده است (شکل ۲). از میان ۲۲ پروتئین ظاهر شده در گیاه جهش‌یافته، پروتئین‌های TSA1، AT1G08750 و AT3G47570 دارای ارتباط زیستی با پروتئین‌های مسیر بیوسنتز و همچنین پروتئین‌های تنظیم‌کننده بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها می‌باشند (شکل ۳).

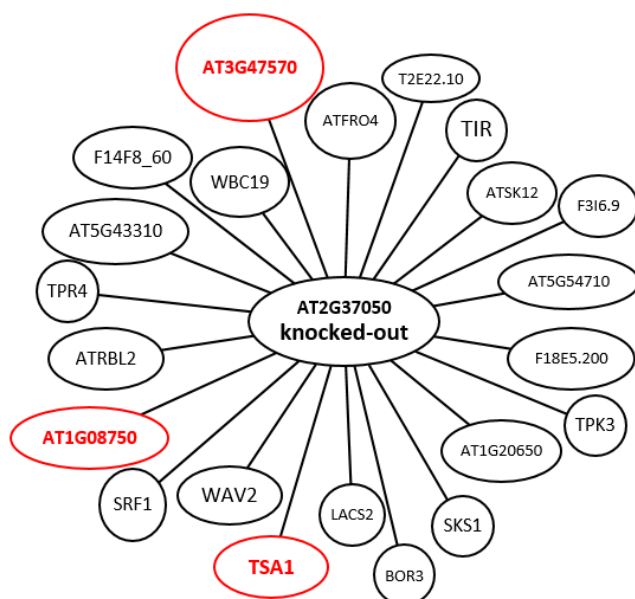
گلوکوزینولات‌ها، این ژن‌ها با ۳ ژن / پروتئین مسیر احیای سولفور و ۱۴ ژن / پروتئین ناقل سولفور به‌عنوان ورودی اولیه الگوریتم GeneMANIA استفاده گردید (جدول ۱).

نتایج و بحث

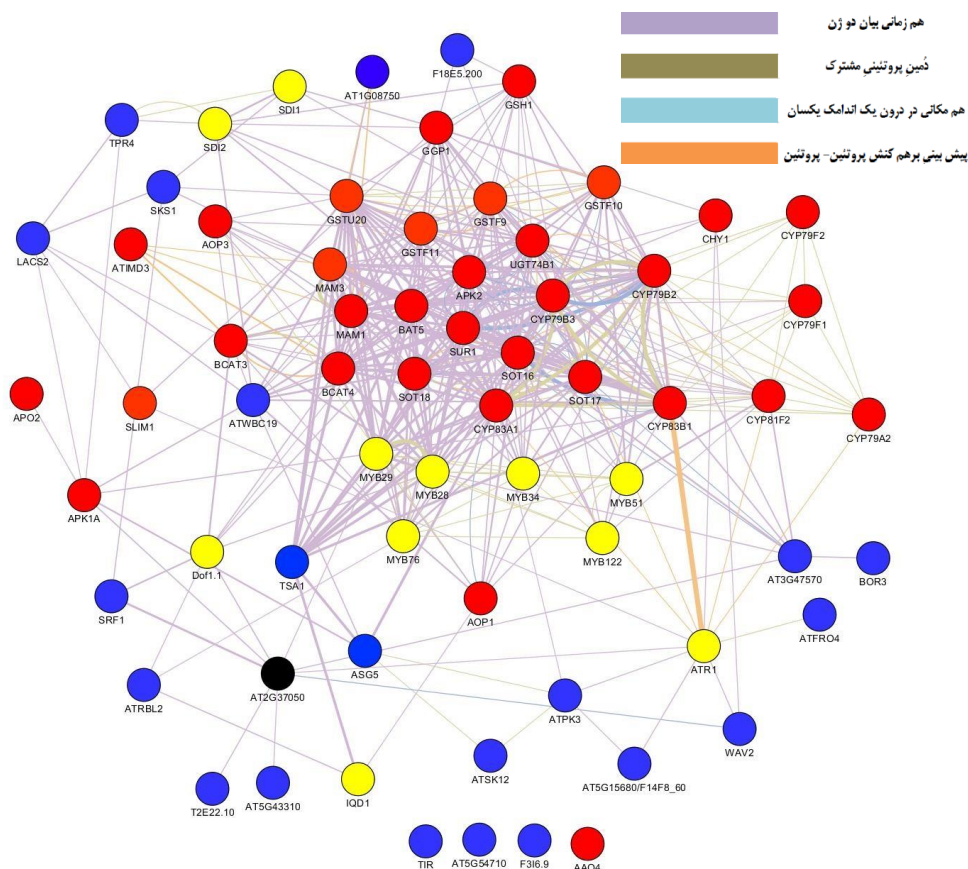
داده‌های پروتئینی مربوط به مطالعه پروتئومیک (داده‌های چاپ نشده) نشان داده‌اند که در گیاه موتانتی که ژن شبه رسپتورکینازی *AT2G37050* در آن خاموش شده است (knockout شده)، ۲۲ پروتئین در مقایسه با گیاه وحشی (کنترل) ظاهر می‌شود (شکل ۱). ارتباطات زیستی بین ۲۲ پروتئین ظاهر شده و پروتئین‌های (ژن‌های) درگیر در مسیر بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها و همچنین درگیر در تنظیم بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها در شکل ۲ به نمایش گذاشته شده است. در این شبکه زیستی پیش بینی برهم کنش پروتئین-پروتئین، وجود دُمین پروتئینی مشترک، هم بیانی ژن‌ها و هم مکانی دو پروتئین در درون یک

جدول ۱. لیست ژن / پروتئین‌های استفاده شده در شبکه زیستی

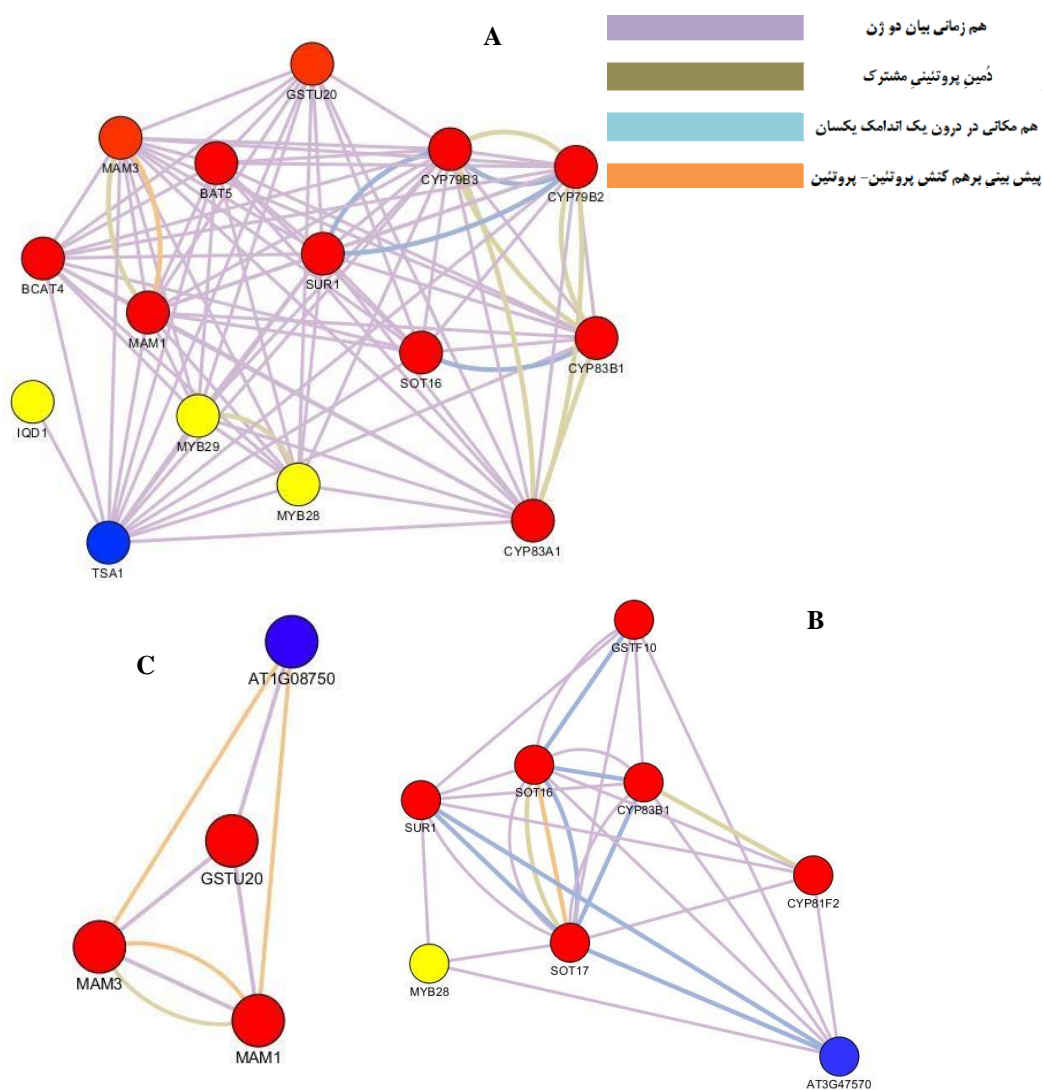
AT1G08750/F22O13_24, AT1G20650, TSA1, AT3G47570, AT5G43310, AT5G15680/F14F8_60, AT5G54710, ATFRO4, ATPK3, ATRBL2, ATSK12, ATWBC19, BOR3, F18E5.200, F316.9, LACS2, SKS1, SRF1, T2E22.10, TIR, TPR4, WAV2	پروتئین‌های ظاهر شده در گیاه آرآیدوپسیس تالیانا به دنبال از کار افتاده‌گی ژن <i>AT2G37050</i>
AAO4, AOP1, AOP3, APK2, APK1A, GGP1, BAT5, BCAT3, BCAT4, CHY1, CYP79A2, CYP79B2, CYP79B3, CYP79F1, CYP79F2, CYP83A1, CYP83B1, APO2, GSH1, GSTF10, GSTF11, GSTF9, CYP81F2, GSTU20, ATIMD3, MAM1, MAM3, SOT16, SOT17, SOT18, SUR1, UGT74B1	ژن / پروتئین‌های درگیر در مسیر بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها
ATR1, SDI1, SDI2, SLIM1, IQD1, MYB122, MYB28, MYB29, MYB34, MYB51, MYB76, Dof1.1	ژن / پروتئین‌های درگیر در تنظیم مسیر بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها
APR, APK, SIR	ژن / پروتئین‌های درگیر در مسیر احیای سولفور
Sultr1;1, Sultr1;2, Sultr1;3, Sult2;1, Sult2;2, Sultr3;1, Sultr3;2, AST91, Sultr3;4, Sultr3;5, Sultr4;1, Sultr4;2, Sultr5;1, Sultr5;2	ژن / پروتئین‌های ناقل سولفور



شکل ۱. پروتئین‌های ظاهر شده در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا به دنبال از کار افتادگی ژن *AT2G37050* (نتایج چاپ نشده)



شکل ۲. ارتباط زیستی بین پروتئین‌های ظاهر شده به دنبال از کار افتادگی ژن *AT2G37050* و ژن‌های درگیر در مسیر بیوستز و تنظیم بیوستز گلوکوزینولاتها با استفاده از الگوریتم GeneMANIA. دایره‌های قرمز رنگ، ژن‌های درگیر در بیوستز گلوکوزینولاتها، دایره‌های زرد رنگ، ژن‌های تنظیم کننده بیوستز گلوکوزینولاتها و دایره‌های آبی رنگ، ۲۲ پروتئین ظاهر شده به دنبال از کار افتادگی ژن *AT2G37050* را نشان می‌دهند. خطوط بنفش بیانگر هم بیانی، خطوط آبی نشان‌دهنده هم مکانی، خط خاکستری نشان‌دهنده وجود دُمین پروتئینی مشترک و خط نارنجی بیانگر پیش‌بینی برهم کنش پروتئین- پروتئین است.



شکل ۳. ارتباط زیستی بین ژن *TSA1* (A)، *AT3G47570* (B) و *AT3G47570* (C) با ژن‌های مسیر بیوسنتز و تنظیم بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها با استفاده از الگوریتم GeneMANIA. خطوط بنفش بیانگر هم بیانی، خطوط آبی نشان‌دهنده هم مکانی، خط خاکستری نشان‌دهنده وجود دُمین پروتئینی مشترک و خط نارنجی بیانگر پیش‌بینی برهم کنش پروتئین-پروتئین است. دایره‌های قرمز رنگ، ژن‌های درگیر در بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها، دایره‌های زرد رنگ، ژن‌های تنظیم‌کننده بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها را نمایش می‌دهند.

حشرات *Pieris rapae* و *Spodoptera exigua* بیان ژن *TSA1* در برگ‌های گیاه آرابیدوپسیس تالیانا به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (Appel *et al.*, 2014). نتایج نشان داده است پروتئین *TSA1* و ۱۱ پروتئین درگیر در مسیر بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها و ۳ پروتئین تنظیم‌کننده بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها به‌طور همزمان بیان می‌شوند (شکل ۳A). از میان ۱۱ پروتئین، چندین پروتئین درگیر در بیوسنتز آلیفاتیک گلوکوزینولات‌ها می‌باشند که می‌توان به موارد زیر

پروتئین *TSA1* در غشای تیلاکوئید، غشا هسته، واکوئل، پراکسیزوم و هسته قرار دارد. این پروتئین دارای محلی برای اتصال یون کلسیم می‌باشد (www.arabidopsis.org/about/index.jsp). تحقیقات مختلف نشان داد که پروتئین *TSA1* در حفظ و نگهداری بافت مریستم (Suzuki *et al.*, 2005) و همچنین ممکن است در جوانه‌زنی دانه‌های آرابیدوپسیس تالیانا در تاریکی دخالت داشته باشد (Li *et al.*, 2011). در مطالعه‌ای دیگر در پاسخ به حمله

از قبیل مطالعه عوامل تنظیمی نمو پرچم (Mandaokar *et al.*, 2006)، عوامل تنظیمی تشکیل تریکوم (Morohashi & Grotewold, 2009)، تنظیم سنتز اکسین (Jones *et al.*, 2010)، مطالعه تاثیر شرایط نوری بر مقاومت گیاه علیه پاتوژن (Cerrudo *et al.*, 2012)، بررسی کمبود آهن در ریشه (Stein & Waters, 2012)، مطالعه سیگنالینگ ناشی از حمله پاتوژن و آفت (De Vos *et al.*, 2005)، پاسخ ریشه گیاه به تنش غیر زنده (Dinneny *et al.*, 2008)، سیگنالینگ اکسین (Yang *et al.*, 2010)، مطالعه شبکه تنظیمی نمو اجزای گل (Reeves *et al.*, 2012)، مطالعه بقا دانه در شرایط کمبود اکسیژن (Christianson *et al.*, 2009) و پاسخ به منابع مختلف نیتروژنی (Patterson *et al.*, 2010) در گیاه آرابیدوپسیس گزارش شده است. همچنین هم بیان ژن *TSA1* و *SURI* (که درگیر در بیوسنتز هسته مرکزی هر دو نوع آلیفاتیک و ایندولیک گلوکوزینولات‌ها می‌باشد) در مطالعه عوامل تنظیمی نمو پرچم (Mandaokar *et al.*, 2006)، سیگنالینگ اکسین (Yang *et al.*, 2010)، بررسی ارتباط بین پاسخ به تنش و نمو ریشه (Iyer-Pascuzzi *et al.*, 2011) و عوامل تحریک کننده گلهی (Iñigo *et al.*, 2012) مورد تایید قرار گرفته است. علاوه بر ژن‌های درگیر در بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها، هم بیان ژن‌های *MYB28* و *MYB29* که در تنظیم بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها نقش دارند با ژن *TSA1* در مطالعه ترانسکریپتوم مریستم نوک ساقه (Yadav *et al.*, 2009)، پاسخ به تغییرات دمایی (Kumar & Wigge, 2010)، بررسی پاسخ به میزان بالای تشعشع (Kleine *et al.*, 2007) و بررسی جابجایی سولفات در دانه در حال رشد (Zuber *et al.*, 2010) در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا مشاهده شده است. همچنین در بررسی مراحل رشد گیاه آرابیدوپسیس تالیانا، افزایش بیان ژن *TSA1* در برچه‌ها و رویش

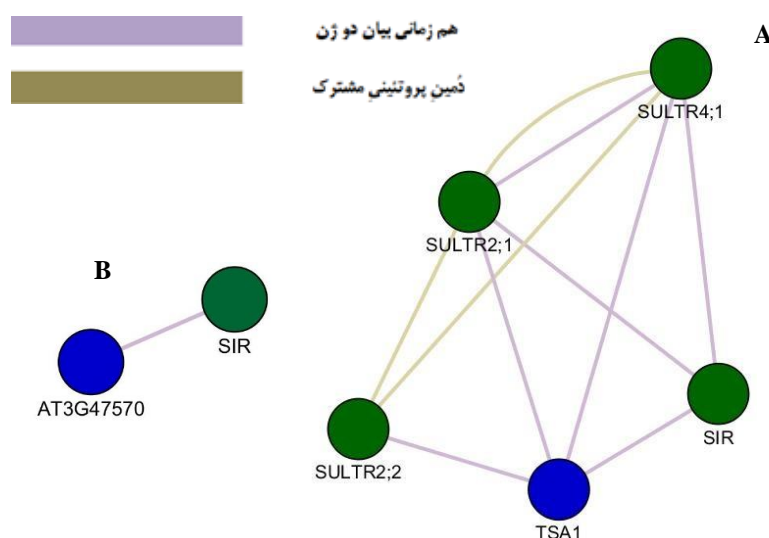
اشاره کرد: ژن‌های *BAT5* و *BCAT4* که هم بیانی آنها با ژن *TSA1* در مطالعات نقش تنظیمی اکسین (Armstrong *et al.*, 2004)، برهم‌کنش اتیلن و اکسین (Stepanova *et al.*, 2007)، مطالعه پاسخ شوک حرارتی (Sugio *et al.*, 2009)، سیگنالینگ اکسین (Yang *et al.*, 2010)، مطالعه تمایز سلول‌های روزنه (Hachez *et al.*, 2011)، بررسی ارتباط بین پاسخ به تنش و نمو ریشه (Iyer-Pascuzzi *et al.*, 2011) و مطالعه کنترل هموستازی آهن (Sivitz *et al.*, 2012)، در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا مشاهده شده است. از دیگر ژن‌های مسئول بیوسنتز زنجیر جانبی آلیفاتیک گلوکوزینولات‌ها می‌توان به *MAM1* و *MAM3* اشاره کرد که دارای هم بیانی با ژن *TSA1* می‌باشند و این هم بیانی در بررسی سیگنالینگ اکسین (Yang *et al.*, 2010) و تنظیم ژن‌های چرخه سلولی در ریشه آرابیدوپسیس تالیانا (Sozzani *et al.*, 2010) نشان داده شده است. به همین ترتیب هم بیانی ژن *TSA1* با ژن‌های دخیل در بیوسنتز هسته مرکزی آلیفاتیک گلوکوزینولات‌ها مانند *CYP83A1* و *GUST20* در مطالعاتی از قبیل نقش تنظیمی اکسین (Armstrong *et al.*, 2004)، سیگنالینگ اکسین (Yang *et al.*, 2010)، عوامل تنظیمی تشکیل تریکوم (Morohashi & Grotewold, 2009)، ارتباط بین پاسخ به تنش و نمو ریشه (Iyer-Pascuzzi *et al.*, 2011)، عوامل تحریک کننده گلهی (Iñigo *et al.*, 2011)، مطالعه بقا دانه گیاه آرابیدوپسیس در شرایط کمبود اکسیژن (Christianson *et al.*, 2009)، مطالعه فاکتورهای رونویسی درگیر در کنترل هموستازی آهن در گیاه آرابیدوپسیس (Sivitz *et al.*, 2012) دیده شده است. به همین ترتیب بیان ژن *TSA1* و ژن‌های درگیر در سنتز ایندولیک گلوکوزینولات‌ها از قبیل *CYP79B2*، *CYP83B1*، *CYP79B3* و *SOT16* از الگوی مشابه‌ای برخوردار بوده است (هم بیانی ژن‌ها). این هم بیانی در مطالعاتی

مطالعه بر روی سلول‌های مناطق مریستمی، رشد طولی و تمایز ریشه گیاه آرابیدوپسیس مشاهده گردیده (Brady *et al.*, 2007) که به نوبه خود می‌تواند احتمال مشارکت این سه پروتئین در یک عملکرد فرضی زیستی را تقویت نماید.

بر اساس یافته‌های Brady *et al.* (2007) احتمال برهم کنش پروتئین- پروتئین بین پروتئین MAM3 و MAM1 با پروتئین‌های AT1G08750 و AT1G08750 پیش‌بینی شده است. بیان ژن *AT1G08750* و *GSTU20* نیز با الگوی مشابه گزارش شده است (Goda *et al.*, 2008).

همچنین با استفاده از مطالعات بیوانفورماتیک ارتباط زیستی بین سه ژن *AT3G47570*، *TSA1* و *AT1G08750* با ژن‌های ناقلین سولفور و ژن‌های مسیر احیای سولفور بررسی شده است. نتایج نشان داده است که ارتباط زیستی از نوع هم‌بیانی بین ژن *TSA1* و ژن‌های ناقلین سولفور از جمله *Sultr 2;1*، *Sultr 2;2* و *Sultr 4;1* و همچنین ژن *SIR* (از مسیر احیای سولفور) وجود دارد (شکل ۴).

برگچه‌ها گزارش شده است (پایگاه Arabidopsis eFP Browser: به بخش URLs مراجعه شود). علاوه بر ژن *TSA1* دو ژن *AT3G47570* و *AT1G08750* نیز دارای ارتباط زیستی با ژن‌های مسیر بیوسنتز و تنظیم بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها می‌باشند (شکل C و B ۳). ژن *AT3G47570* یک پروتئین غشایی را کد می‌کند که در مسیر سیگنالینگ تیروزین کینازی نقش دارد. این ژن با ژن‌های *SOT16*، *GSTF10*، *CYP83B1*، *CYP81F* و *MYB28* هم‌بیانی داشته و همچنین با ژن‌های *SUR1* و *SOT17* در یک مکان مشترک درون سلولی (هم مکانی) قرار گرفته است (شکل B ۳). هم‌بیانی ژن‌های *AT3G47570* با *SOT16* و *CYP81F2* توسط Kram *et al.* (2009) در مطالعه بر روی بافت‌های گل در آرابیدوپسیس تالیانا مشاهده شده است. همچنین هم‌بیانی ژن *AT3G47570* و *CYP83B1* در بررسی اثر CO_2 ، H_2O_2 و طول روز در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا نشان داده شد (Queval *et al.*, 2012). هم‌مکانی پروتئین‌های *AT3G47570* با *SUR1* و *SOT17* به دنبال



شکل ۴. ارتباط زیستی بین ژن *TSA1* (A) و *AT3G47570* (B) با ژن‌های مسیر احیای سولفور و پروتئین‌های ناقل سولفور با استفاده از الگوریتم GeneMANIA. خطوط بنفش بیانگر هم‌بیانی و خطوط خاکستری نشان‌دهنده دُمین پروتئینی مشترک هستند. دایره‌های سبز رنگ، پروتئین‌های درگیر در مسیر احیای سولفور و پروتئین‌های ناقل سولفور را نمایش می‌دهند.

یافته‌های بیوانفورماتیک در راستای نقش این دو ژن در تنظیم بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها در پژوهش حاضر می‌باشد.

به طور کلی نتایج نشان داده است که مطالعات بیوانفورماتیکی و استفاده از پایگاه‌های متفاوت زیستی روشی کارآمد در جهت طرح فرضیات جدید و جهت‌دهی آزمایشات براساس انبوهی از نتایج تایید شده تحقیقات گذشته می‌باشد (Brady & Provat, 2009). بررسی نقش ژن *TSAl* در تنظیم بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا می‌تواند شرایطی را محیا می‌کند تا با دست‌ورزی ژن یاد شده امکان تغییر در بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها و در نتیجه تغییر در محتوا (کمیت) و ترکیب (انواع) آنها در جهت افزایش کیفیت در گیاهان نزدیک آرابیدوپسیس مانند گیاهان خانواده کلم (*Brassicaceae*) فراهم گردد.

URLs: TAIR. The Arabidopsis Information Resource. www.arabidopsis.org/about/index.jsp.
Arabidopsis eFP Browser. <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>.

REFERENCES

- Appel HM, Fescemyer H, Ehlting J, Weston D, Rehrig E, Joshi T, Xu D, Bohlmann J, Schultz J (2014) Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* to chewing and sucking insect herbivores. *Front. Plant Sci.* 5: 565.
- Armstrong JI, Yuan S, Dale JM, Tanner VN, Theologis A (2004) Identification of inhibitors of auxin transcriptional activation by means of chemical genetics in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 14978-14983.
- Brady SM, Orlando DA, Lee J-Y, Wang JY, Koch J, Dinneny JR, Mace D, Ohler U, Benfey PN (2007) A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science.* 318: 801-806.
- Brady SM and Provat NJ (2009) Web-queryable large-scale data sets for hypothesis generation in plant biology. *Plant Cell.* 21:1034-1051.
- Brown PD, Tokuhisa JG, Reichelt M, Gershenzon J (2003) Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochem.* 62: 471-481.
- Cerrudo I, Keller MM, Cargnel MD, Demkura PV, Wit M de, Patitucci MS, Pierik R, Pieterse CM, Ballaré CL (2012) Low red/far-red ratios reduce *Arabidopsis* resistance to *Botrytis cinerea* and jasmonate responses via a COI1-JAZ10-dependent, salicylic acid-independent mechanism. *Plant Physiol.* 158: 2042-2052.
- Celenza JL, Quiel JA, Smolen GA, Merrikk H, Silvestro AR, Normanly J, Bender J (2005) The *Arabidopsis* ATR1 Myb transcription factor controls indolic glucosinolate homeostasis. *Plant Physiol.* 137: 253-262.

ناقل سولفور Sultr 2;1 در سلول‌های پارانشیم آوند چوبی در ساقه و ریشه، Sultr 2;2 ناقل سولفور در آوند آبکش ریشه و سلول‌های غلاف آوندی برگ (Takahashi *et al.*, 2000)، Sult 4;1 ناقل سولفور در غشا واکوئل (Hawkesford, 2003) و SIR که در احیای سولفیت به سولفید در مسیر احیای سولفور و متعاقب آن تشکیل ترکیبات سولفور دار آلی نقش دارند (Saito, 2004; Hawkesford & De Kok, 2006). همچنین در مطالعه ای بر روی ریشه گیاه آرابیدوپسیس تالیانا در پاسخ به تنش ناشی از کمبود سولفور، بیان ژن *TSAl* به طور معنی‌داری افزایش یافته است (Iyer-Pascuzzi *et al.*, 2011). علاوه بر این، نتایج نشان داده است که ژن *AT3G47570* با ژن SIR هم بیان بوده و بیان این دو ژن از الگوی مشابهی تبعیت می‌کند (Kram *et al.*, 2009). با توجه به اینکه گلوکوزینولات‌ها ترکیبات سولفوردار می‌باشند، ارتباط زیستی بین دو ژن *TSAl* و *AT3G47570* با ژن‌های ناقلین سولفور و همچنین سولفیت ردوکتاز به‌طور جالب توجهی در تایید

- Chen S, Glawischnig E, Jørgensen K, Naur P, Jørgensen B, Olsen CE, Hansen CH, Rasmussen H, Pickett JA and Halkier B A (2003) CYP79F1 and CYP79F2 have distinct functions in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*. *The Plant J.* 33: 923–937.
- Christianson JA, Wilson IW, Llewellyn DJ, Dennis ES (2009) The Low-Oxygen-Induced NAC Domain Transcription Factor ANAC102 Affects Viability of *Arabidopsis* Seeds. *Plant Physiol.* 149: 1724–1738.
- Dinkova-Kostova AT, Kostov RV (2012) Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends Mol. Med.* 18: 337–347.
- Dinneny JR, Long TA, Wang JY, Jung JW, Mace D, Pointer S, Barron C, Brady SM, Schiefelbein J, Benfey PN (2008) Cell identity mediates the response of *Arabidopsis* roots to abiotic stress. *Science.* 320: 942–945.
- Gigolashvili T, Berger B, Mock HP, Müller C, Weisshaar B, Flügge UI (2007) The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J.* 50: 886–901.
- Gigolashvili T, Yatusевич R, Berger B, Müller C, Flügge UI (2007) The R2R3-MYB transcription factor HAG1/MYB28 is a regulator of methionine-derived glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J.* 51: 247–261.
- Goda H, Sasaki E, Akiyama K, Maruyama-Nakashita A, Nakabayashi K, Li W, Ogawa M, Yamauchi Y, Preston J, Aoki K (2008) The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *The Plant J.* 55: 526–542.
- Hachez C, Ohashi-Ito K, Dong J, Bergmann DC (2011) Differentiation of *Arabidopsis* guard cells: analysis of the networks incorporating the basic helix-loop-helix transcription factor, FAMA. *Plant physiol.* 155: 1458–1472.
- Halkier BA, Gershenzon J (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Ann. Rev. Plant Biol.* 57: 303–333.
- Hawkesford MJ (2003) Transporter gene families in plants: the sulfate transporter gene family – redundancy or specialization? *Physiol. Plant.* 117: 155–163.
- Hawkesford MJ and De Kok LJ (2006) Managing sulphur metabolism in plants. *Plant Cell and Environ.* 29: 382–395.
- Hirai MY, Sugiyama K, Sawada Y, Tohge T, Obayashi T, Suzuki A, Araki R, Sakurai N, Suzuki H, Aoki K, Goda H, Nishizawa OI, Shibata D, Saito K (2007) Omics-based identification of *Arabidopsis* Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 6478–6483.
- Hull AK, Vij R, Celenza JL (2000) *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 2379–2384.
- Iñigo S, Alvarez MJ, Strasser B, Califano A, Cerdán PD (2012) PFT1, the MED25 subunit of the plant Mediator complex, promotes flowering through CONSTANS dependent and independent mechanisms in *Arabidopsis*. *The Plant J.* 69: 601–612.
- Iyer-Pascuzzi AS, Jackson T, Cui H, Petricka JJ, Busch W, Tsukagoshi H, Benfey PN (2011) Cell identity regulators link development and stress responses in the *Arabidopsis* root. *Dev. Cell.* 21: 770–782.
- Jazayeri O (2016). Unravelling the genetic basis of hereditary disorders by high-throughput exome sequencing strategies. Dissertation, University of Groningen. The Netherlands.
- Jones B, Gunnerås SA, Petersson SV,

- Tarkowski P, Graham N, May S, Dolezal K, Sandberg G, Ljung K (2010) Cytokinin regulation of auxin synthesis in *Arabidopsis* involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction. *Plant Cell*. 22: 2956–2969.
- Kleine T, Kindgren P, Benedict C, Hendrickson L, Strand A (2007) Wide Gene Expression Analysis Reveals a Critical Role for cryptochrome1 in the Response. *Plant. Physiol.* 144: 1391–1406.
- Kram WB, Xu WW, Carter CJ (2009) Uncovering the *Arabidopsis thaliana* nectary transcriptome: investigation of differential gene expression in floral nectariferous tissues. *BMC Plant Biol.* 9: 92.
- Kumar SV, Wigge PA (2010) H2A. Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell*. 140: 136–147.
- Levy M, Wang Q, Kaspi R, Parrella M P, Abel S, (2005) *Arabidopsis* IQD1, a novel calmodulin-binding nuclear protein, stimulates glucosinolate accumulation and plant defense. *The Plant J.* 43: 79–96.
- Li W, Zang B, Liu C, Lu L, Wei N, Cao K, Deng XW, Wang X (2011) *TSA1* interacts with CSN1/CSN and may be functionally involved in *Arabidopsis* seedling development in darkness. *J. Genet. Genomics.* 38: 539–46.
- Mandaokar A, Thines B, Shin B, Markus Lange B, Choi G, Koo YJ, Yoo YJ, Choi YD, Choi G, Browse J (2006) Transcriptional regulators of stamen development in *Arabidopsis* identified by transcriptional profiling. *The Plant J.* 46: 984–1008.
- Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Tohge T, Saito K, Takahashi H (2006) *Arabidopsis* SLIM1 is a central transcriptional regulator of plant sulfur response and metabolism. *Plant Cell*. 18: 3235–3251.
- Martinez-Sánchez A, Allende A, Bennett RN, Ferreres F, Gil MI (2006) Microbial, nutritional and sensory quality of rocket leaves as affected by different sanitizers. *Postharvest Biol. Technol.* 42: 86–97.
- Mikkelsen MD, Hansen CH, Wittstock U, Halkier BA (2000) Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *J. Biol. Chem.* 275: 33712–33717.
- Morohashi K, Grotewold E (2009) A systems approach reveals regulatory circuitry for *Arabidopsis* trichome initiation by the GL3 and GL1 selectors. *PLoS Genet.* doi:10.1371/journal.pgen.1000396
- Naur, P, Petersen BL, Mikkelsen MD, Bak S, Rasmussen H, Olsen CE, Halkier BA (2003) CYP83A1 and CYP83B1, two nonredundant cytochrome P450 enzymes metabolizing oximes in the biosynthesis of glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133: 63–72.
- Padilla G, Cartea ME, Velasco P, de Haro A, Ordás A (2007) Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa*. *Phytochemistry.* 68: 536–545.
- Patterson K, Cakmak T, Cooper A, Lager I, Rasmusson AG, Escobar MA (2010) Distinct signalling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium- and nitrate-supplied plants. *Plant Cell Environ.* 33: 1486–1501.
- Petersen BL, Andréasson E, Bak S, Agerbirk N, Halkier BA (2001) Characterization of transgenic *Arabidopsis thaliana* with metabolically engineered high levels of p-hydroxy benzyl glucosinolate. *Planta.* 212: 612–618.
- Petersen B, Chen S, Hansen C, Olsen C, Halkier B (2002) Composition and content of glucosinolates in developing *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 214: 562–571.
- Reeves PH, Ellis CM, Ploense SE, Wu M-F, Yadav V, Tholl D, Chételat A, Haupt

- I, Kennerley BJ, Hodgens C, others (2012) A regulatory network for coordinated flower maturation. *PLoS Genet.* 8: e1002506.
- Saito K (2004) Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiol.* 136: 2443–2450.
- Sivitz AB, Hermand V, Curie C, Vert G (2012) Arabidopsis bHLH100 and bHLH101 control iron homeostasis via a FIT-independent pathway. *PLoS One.* 7: e44843.
- Sozzani R, Cui H, Moreno-Risueno MA, Busch W, Norman JM Van, Vernoux T, Brady SM, Dewitte W, Murray JAH, Benfey PN (2010) Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature.* 466: 128–32.
- Skirycz A, Reichelt M, Burow M, Birkemeyer C, Rolcik J, Kopka J, Zanon MI, Gershenzon J, Strnad M, Szopa J, Mueller-Roeber B, Witt I (2006) DOF transcription factor AtDof1.1 (OBP2) is part of a regulatory network controlling glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant J.* 47: 10–24.
- Sønderby I E, Geu-Flores F and Halkier BA (2010) Biosynthesis of glucosinolates – gene discovery and beyond. *Trends Plant Sci.* 15: 283–290.
- Stein RJ, Waters BM (2012) Use of natural variation reveals core genes in the transcriptome of iron-deficient *Arabidopsis thaliana* roots. *J. Exp. Bot.* 63: 1039–55.
- Stepanova AN, Yun J, Likhacheva AV, Alonso JM (2007) Multilevel interactions between ethylene and auxin in Arabidopsis roots. *Plant Cell.* 19: 2169–2185.
- Sugio A, Dreos R, Aparicio F, Maule AJ (2009) The cytosolic protein response as a subcomponent of the wider heat shock response in Arabidopsis. *Plant Cell.* 21: 642–654.
- Suzuki T, Nakajima S, Morikami A, Nakamura K (2005) An Arabidopsis protein with a novel calcium-binding repeat sequence interacts with TONSOKU/MGOUN3/BRUSHY1 involved in meristem maintenance. *Plant cell physiol.* 46: 1452–1461.
- Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith FW, Blake-Kalff M, Hawkesford MJ and Saito K (2000) The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J.* 23: 171–182.
- Traka M, Mithen R (2009) Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochem. Rev.* 8: 269–282.
- Tripathi M, Mishra A (2007) Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 132: 1–27.
- Vos MD, Oosten VR, Poecke RM, Pelt JA, Pozo MJ, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux J-P, Loon L, Dicke M, others (2005) Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18: 923–937.
- Yadav RK, Girke T, Pasala S, Xie M, Reddy GV (2009) Gene expression map of the Arabidopsis shoot apical meristem stem cell niche. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 4941–4946.
- Yang X-Y, Chen W-P, Rendahl AK, Hegeman AD, Gray WM, Cohen JD (2010) Measuring the turnover rates of Arabidopsis proteins using deuterium oxide: an auxin signaling case study. *The Plant J.* 63: 680–695.
- Zuber H, Davidian J-C, Aubert G, Aimé D, Belghazi M, Lugan R, Heintz D, Wirtz M, Hell R, Thompson R, Gallardo K (2010) The seed composition of Arabidopsis mutants for the group 3 sulfate transporters indicates a role in sulfate translocation within developing seeds. *Plant Physiol.* 154: 913–926.
- Zuberi K, Franz M, Rodriguez H, Montojo J, Lopes CT, Bader GD, Morris Q (2013) Gene MANIA prediction server 2013 update. *Nucleic. Acids. Res.* 41: 115–122.