

## Identification of functional pathways and key genes effective in response to nitrogen deficiency stress in rice

Shayan Kazemi-Lifshagerd<sup>1</sup>, Atefeh Sabouri<sup>1\*</sup>(ORCID: 0000-0002-5831-768X), Zahra Pezeshkian<sup>2,3</sup>, Mohammad Mehdi Sohani<sup>4</sup>

1. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. Department of Animal Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

3. BioGenTAC Inc., Technology Incubator of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran-North Branch (ABRII), Rasht, Iran.

4. Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

Correspondence:

Atefeh Sabouri

Email: [a.sabouri@guilan.ac.ir](mailto:a.sabouri@guilan.ac.ir)

Received: 07, Jun. 2024

Accepted: 06, Sep. 2024

### How to cite:

Kazemi-Lifshagerd, Sh., Sabouri, A., Pezeshkian, Z., & Sohani, M. M. (2024). Identification of functional pathways and key genes effective in response to nitrogen deficiency stress in rice. *Crop Biotechnology*, 14 (1), 29-43. (DOI: [10.30473/cb.2024.71521.1971](https://doi.org/10.30473/cb.2024.71521.1971))

### ABSTRACT

Rice, as the primary food source for a large portion of the global population, holds significant strategic importance worldwide. Variations in the availability of elements such as nitrogen can greatly impact rice production. Nitrogen is crucial for rice growth, development, and performance by influencing various physiological and biochemical processes in plant cells. Considering the importance of the role of nitrogen, the aim of this research was to identify key genes, study biological pathways, and analyze important protein-protein interactions in rice under nitrogen deficiency stress. In this regard microarray expression data sets were extracted from the NCBI database, and differentially expressed genes between control and stress conditions were identified. Using DAVID online tools, the molecular functions, pathways, and biological processes related to these genes were investigated. Cytoscape software was used to construct a gene network, and ten key genes were identified. The study revealed that signaling pathways and amino acid production are prominently activated in the initial hours of nitrogen stress. Under nitrogen deficiency, the expression of genes involved in iron ion transport and amino acid biosynthesis significantly increases. The synthesis of iron ion transporters is crucial for photosynthesis in plant leaves, contributing to the balance and stability of photosynthetic products and leading to changes in the plant's morphological characteristics and performance. It is expected that these key genes can be used in breeding programs to deal with nitrogen deficiency stress.

### KEY WORDS

Bioinformatics analysis, Gene expression, Iron ion transporter, Microarray, Protein-protein network.



## «مقاله پژوهشی»

# شناسایی مسیرهای عملکردی و ژن‌های کلیدی مؤثر در پاسخ به تنش کمبود نیتروژن در برنج

شایان کاظمی لیف‌شاگرد<sup>۱</sup>، عاطفه صبوری<sup>۱\*</sup>، زهرا پزشکیان<sup>۲</sup>، محمد مهدی سوهانی<sup>۳</sup>

### چکیده

برنج، به‌عنوان غذای اصلی قشر وسیعی از مردم دنیا، نقشی مهم و استراتژیک در سراسر جهان ایفا می‌کند. در فرآیند تولید برنج، تغییر در میزان عناصر در دسترس این گیاه از جمله نیتروژن، می‌تواند عملکرد این گیاه را به طور قابل توجهی تحت تأثیر قرار دهد. نیتروژن با تأثیر قابل توجه بر فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در سلول‌های گیاهی، نقش مهمی در تولید برنج ایفا می‌کند و بر رشد، نمو و عملکرد آن تأثیر می‌گذارد. با توجه به اهمیت نقش نیتروژن، هدف از این تحقیق، شناسایی ژن‌ها، مطالعه مسیرهای بیولوژیکی و برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین مهم در برنج در واکنش به تنش کمبود نیتروژن بود. در این راستا مجموعه داده بیان ریزآرایه از پایگاه داده NCBI استخراج و ژن‌های با بیان متفاوت بین تیمار شاهد و شرایط تنش شناسایی شد. عملکردهای مولکولی و مسیرها و فرآیندهای بیولوژیکی مرتبط با این ژن‌ها با استفاده از ابزار برخط DAVID مورد بررسی و شناسایی قرار گرفت. به کمک نرم‌افزار Cytoscape پس از ترسیم شبکه ژنی، تعداد ده ژن به‌عنوان ژن‌های کلیدی در شبکه، انتخاب شدند. نتایج حاصل از پژوهش نشان داد فرآیند مواجهه و پاسخ گیاه به تنش در ساعات ابتدایی اعمال تنش، شامل مسیرهای سیگنال دهی و تولید آمینواسیدها است. در شرایط کمبود نیتروژن در خاک، بیان ژن‌های دخیل در فرآیند انتقال یون آهن و بیوسنتز آمینواسیدها به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. سنتز ناقل‌های یون آهن در فرآیند فتوسنتز برگ گیاه دخیل بوده و به نحوی موجب ایجاد تعادل و پایداری تولیدات فتوسنتزی می‌شود و باعث تغییر در خصوصیات مورفولوژی و عملکرد گیاه می‌شود. انتظار می‌رود که از این ژن‌های کلیدی، بتوان در برنامه‌های به‌نژادی در مقابله با تنش کمبود نیتروژن استفاده کرد.

### واژه‌های کلیدی

آنالیز بیوانفورماتیکی، بیان ژن، انتقال دهنده یون آهن، ریزآرایه، شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین.

۱. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.  
۲. گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.  
۳. بخش تحقیق و توسعه شرکت بیوژن تک، مرکز رشد واحدهای فناوری پژوهش‌کننده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور، رشت، ایران.  
۴. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

نویسنده مسئول:

عاطفه صبوری

رایانامه: [a.sabouri@guilan.ac.ir](mailto:a.sabouri@guilan.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۱۶

### استناد به این مقاله:

کاظمی لیف‌شاگرد، شایان؛ صبوری، عاطفه؛ پزشکیان، زهرا و سوهانی، محمد مهدی (۱۴۰۳). شناسایی مسیرهای عملکردی و ژن‌های کلیدی مؤثر در پاسخ به تنش کمبود نیتروژن در برنج. فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۱)، ۲۹-۴۳.

(DOI: 10.30473/cb.2024.71521.1971)

## مقدمه

با افزایش سریع جمعیت کره زمین، نیاز به تأمین غذا نیز بیشتر می‌شود و کارشناسان افزایش بازده کشاورزی را تنها راه حل این مشکل می‌دانند. گروهی از افراد بر این عقیده‌اند که نقش برنامه‌های کنترل جمعیت مؤثرتر باشد اما برای جلوگیری از گسترش سوء‌تغذیه لازم است برنامه‌های افزایش تولید غذا و کنترل جمعیت به طور توأم اجرا شوند (امام، ۱۳۹۰). در بین محصولات گیاهی، غلات، به‌عنوان یک گروه مهم از گیاهان زراعی تا ۷۰ درصد غذای مردم دنیا را تأمین می‌کنند. در بین غلات نیز برنج پس از گندم، مهم‌ترین ماده غذایی دنیاست و غذای عمده‌ی بیش از نیمی از جمعیت کره زمین را تشکیل می‌دهد (امام، ۱۳۹۰؛ خدابنده، ۱۳۷۴). تقریباً ۹۵ درصد کشت برنج در جهان به قاره آسیا اختصاص دارد که دارای دوزیرگونه اصلی ایندیکا و ژاپونیکا می‌باشد. این دو زیرگونه در کارایی جذب نیتروژن تفاوت‌هایی با یکدیگر دارند (Li et al., 2022).

عملکرد در گیاهان به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم به تأمین عناصر مهم و حیاتی از جمله نیتروژن، فسفر و پتاسیم وابسته است. کمبود نیتروژن منجر به تغییرات مورفولوژیکی اندام هوایی مانند شکل برگ و تغییر در میزان غلظت مواد در سلول‌ها می‌شود. در صورت تداوم این تنش، فرآیند پیری سرعت یافته و مرگ سلولی را سرعت می‌بخشد (Zakari et al., 2020).

حدود ۸۰ درصد ماده خشک گیاهان توسط فتوسنتز تأمین می‌شود و در حقیقت فتوسنتز وظیفه دریافت، تولید انرژی و تبدیل آن به حالت قابل‌استفاده برای گیاه را بر عهده دارد (صبوری و حسینی، ۱۳۹۶). نتایج پژوهشی با اعمال تنش هم‌زمان دو عنصر نیتروژن و پتاسیم و بررسی اثرات آن بر فتوسنتز نشان داد که فرآوری کربن دی‌اکسید به‌وسیله فرآیندهای بیوشیمیایی خاصی محدود و کنترل می‌شود و فعالیت‌های روزنه‌ای، مزوفیلی و بیوشیمیایی به‌وسیله تغذیه عناصر نیتروژن و فسفر تنظیم می‌شوند (Hou et al., 2018).

بررسی این تغییرات از دیدگاه مولکولی نشان می‌دهد که همه این فعالیت‌ها توسط بیان مجموعه‌ای از ژن‌ها در زمان، بافت و مقدار بیان مناسب آنها کنترل می‌شود. علیرغم گسترش سریع دانش در طول سال‌های گذشته در برنج که یک گیاه مدل در تحقیقات ژنومی غلات است، داده‌های پروفایل رونوشت ژن‌های مرتبط با فرآیندهای رشد و نمو همچنان ناکافی است (Wang et al., 2010). گیاهان همواره برای مقابله با تنش‌های زنده و غیر زنده از روش تغییر میزان بیان ژن‌ها استفاده می‌کنند. سطوح مختلف بیان ژن، اساس تفاوت در فنوتیپ‌های یک موجود است که تحت تأثیر عوامل مختلفی قرار می‌گیرد (Groen et al., 2020). در این راستا دو فرآیند مهم برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین (PPIs) و برهمکنش‌های رونویسی-تنظیمی (TRIs) ساختار کلی شبکه برهمکنش ترکیبی مولکول‌ها را تشکیل می‌دهند. ژن‌ها و پروتئین‌ها با ایجاد چرخه‌های مولکولی، سلول را برای پردازش اطلاعات و پاسخ به تنش‌های محیطی توانا می‌سازند. از این رو شناسایی الگوهای مشخص در این شبکه‌های برهمکنش همواره یک چالش بزرگ محسوب می‌شود که می‌تواند برخی مکانیسم‌های اساسی سلولی را آشکار سازد (Yeger-Lotem et al., 2004).

در کشاورزی پایدار، توسعه ارقام برنج به همراه افزایش کارایی استفاده از نیتروژن مطرح می‌شود که در این راستا مطالعه چگونگی پاسخ برنج به کمبود نیتروژن در خاک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Li et al., 2022).

با وجود اینکه نواحی تنظیمی ژن‌های گیاهی در مقایسه با ژن‌های جانوری کوچکتر هستند اما گیاهان واجد تعداد مساوی یا بیشتری از فاکتورهای رونویسی هستند. این فراوانی فاکتورهای رونویسی در گیاهان فرصت ارزشمندی را برای کشف چگونگی کنترل شبکه‌های پیچیده تنظیم ژن در توسعه موجودات چند سلولی فراهم می‌کند (Schmid et al., 2005). در دهه‌های اخیر تکنولوژی ریزآرایه امکان بررسی بیان ژن با دقت بالا را فراهم ساخته است و یک راهکار مهم برای بررسی الگوی بیان ژن گسترده در ژنوم است (Cao et al., 2012). استفاده از

<sup>2</sup> Transcription–regulation interaction

<sup>1</sup> Protein–protein interaction

فعالیت‌های متابولیکی مربوط به قند، آمینواسید و فنیل پروپانویید شرکت دارند. همچنین در ریشه، فاکتور رونویسی *OSJAZ9* بارزترین فاکتور القا شده در شرایط کمبود آمونیوم بود و در پاسخ به وفور آمونیوم، فاکتورهای *JAZ9* بیش از حد بیان داشتند. همچنین گزارش شد *OsCOII* باعث افزایش معنی‌دار در فعالیت‌های متابولیکی ریشه، جذب آمونیوم، آمینواسید و قند می‌شود (Sun et al., 2020). ساختار ریشه به وسیله سیستم‌های مورفولوژیکی تنظیم می‌شود که به دسترس بودن مواد مغذی مانند نیتروژن حساس است. در شرایط تنش نیتروژن، نتایج تحقیقات نشان داده است که تعداد ۳۹۰۸ ژن اختلاف بیان معنی‌دار داشتند که از این میان، پروتئین سنتزکننده گلوتامین (*GS2*)، پروتئین فرآوری آمونیوم کلروپلاستی، پروتئین شناخته‌شده‌ای بود که افزایش بیان معنی‌داری نشان داد. تمرکز غیر منتظره *GS2* از اندام هوایی به ریشه در شرایط کمبود نیتروژن، می‌تواند بیانگر یک مسیر فرآوری نیتروژن به‌وسیله فعالیت *GS2* باشد. علاوه بر آن، مشاهده شد در صورت تداوم تنش کمبود نیتروژن، انتقال دهنده‌های نیتروژن و عوامل فرآوری نیتروژن افزایش بیان معنی‌داری نشان دادند (Liang et al., 2021).

جذب نیتروژن به حالت نیترات یا آمونیوم به وضعیت خاک، ناقلان نیترات (*NRTs*) و ناقلان آمونیوم (*AMTs*) بستگی دارد. *NRT1* (یا *NPF*) و *NRT2* از مهم‌ترین خانواده‌های ژنی مسئول انتقال نیترات در برنج هستند. این انتقال دهنده‌ها به منظور جذب نیترات، به طور معنی‌داری در بیرونی‌ترین سلول‌های ریشه و همچنین در ریشه‌های موتی، بیان می‌شوند. بیان *OsNPF2.2* نیز به‌وسیله نیترات، کنترل می‌شود و به عواملی مانند pH و تمایل پایین ناقلان بستگی دارد. ناقل *OsNPF2.2* در غشای پلاسمایی تعبیه شده و بیان آن عمدتاً در سلول‌های آوند چوبی شناسایی شده است. همچنین در آوند‌های آبکش و چوبی نیز بیان نمونه‌های دیگری از این ناقل ریشه شناسایی شده است (Nazish et al., 2021).

Huang et al. (2021) نشان دادند تغییرات نیتروژن با تغییرات میزان انتقال ساکارز در برنج همراه است. در گیاهانی که ژن مسئول انتقال ساکارز (*OsDOF11*) دچار خاموشی شده باشد، میزان جذب نیتروژن نیز کاهش

داده‌های موجود در پایگاه‌های داده و بررسی آن‌ها می‌تواند به‌عنوان روشی برای شناسایی مسیرهای بیولوژیکی، مورد استفاده قرار گیرد و ضمن صرفه‌جویی در زمان با صرف حداقل هزینه، نتایج دقیقی را ارائه نماید.

### پیشینه پژوهش

افزودن کود نیتروژن در سطوح مختلف باعث ایجاد تغییرات معنی‌دار در فاکتورهای رشدی، اجزای عملکرد و نیتروژن دانه می‌شود. به عبارت دیگر استفاده از کودهای شیمیایی در مراحل مختلف رشد اثرات معنی‌داری روی رشد گیاه دارد (Chaturvedi, 2005). طول ریشه و زیست‌توده آن در شرایط کمبود نیتروژن افزایش می‌یابد ولی در مقابل، طول اندام هوایی و زیست‌توده آن کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد افزایش طول ریشه یکی از واکنش‌های سازگاری گیاه نسبت به کمبود نیتروژن برای افزایش جذب باشد و در عین حال زمانی که نیتروژن بیش از حد مورد نیاز باشد، رشد ریشه و اندام هوایی هر دو باهم محدود می‌شوند (Wang et al., 2020).

به منظور افزایش کارایی استفاده از کود نیتروژن، عوامل رونویسی به‌عنوان اهداف بالقوه شناخته می‌شوند. اگرچه تعداد فاکتورهای رونویسی بسیاری در برنج شناسایی شده‌اند که مرتبط با تنش کمبود نیتروژن هستند، اما عملکرد آنها به طور ضعیفی مورد بررسی قرار گرفته است (Wang et al., 2020).

مصرف نیتروژن در برنج از طریق جذب آمونیوم ( $\text{NH}_4^+$ ) و فرآوری آن در ریشه، فرآیند پیچیده‌ای است که در طول مراحل مختلف رشد و نمو به عوامل متعددی از جمله تعامل نیتروژن با کربن و انرژی سایر فعالیت‌های متابولیکی وابسته است. گزارش شده است ژن‌های *GSI* و *NADH* در فرآیند انتقال نیتروژن در دوره پیری گیاه مؤثر هستند (Tabuchi et al., 2007). محدودیت آمونیوم، باعث به وجود آمدن مجموعه‌ای از واکنش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی می‌شود که به برنج در جذب بهینه نیتروژن کمک می‌کنند. در تحقیقی که به منظور بررسی رونوشت ژن‌های برنج تحت تنش کمبود نیتروژن صورت گرفت مشخص شد ژن‌هایی که افزایش بیان داشته‌اند در

متفاوت از ابزار برخط GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r>) استفاده شد. معیار انتخاب ژن‌های با بیان متفاوت (DEG) عبارت از  $|\log_{2}FC| \geq 1$  و  $P\text{-value} < 0.05$  بود. سپس نمودارهای جعبه‌ای و آتشفشانی مربوط به ژن‌ها بررسی شد.

### بررسی هستی‌شناسی ژن‌های منتخب

با توجه به اینکه مجموعه داده‌های در مقیاس ژنوم (بزرگ) به‌ویژه داده‌های ریزآرایه و مطالعات پروتئومی، دانش بیولوژیکی گسترده دارند، تفسیر آن‌ها تبدیل به یک چالش بزرگ شده است. ابزار <sup>۵</sup> DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) به صورت یک برنامه تحت وب می‌تواند داده‌های ژنومی را به همراه خلاصه گرافیکی آن ادغام و ذخیره کند. علاوه بر آن فهرست ژن‌ها یا پروتئین‌ها به سرعت بررسی شده و با توجه به ماهیت داده برای دسته‌های هستی‌شناسی ژن، دامنه پروتئین و مسیرهای بیوشیمیایی طبقه‌بندی می‌شوند (Dennis *et al.*, 2003)، که در مطالعه حاضر به منظور شناسایی مسیرهای مهم زیستی و همین‌طور هستی‌شناسی ژن‌های DEG که شامل بخش‌های فرآیند بیولوژیکی (BP)، عملکرد مولکولی (MF) و اجزای سلولی (CC) است، از ابزار برخط DAVID استفاده شد.

### بررسی شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین و شناسایی ژن‌های منتخب

برای آنالیز و بررسی شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین از نرم‌افزار Cytoscape نسخه 3.10.0 و برای یافتن ژن‌های کلیدی از افزونه cytoHubba در نرم‌افزار Cytoscape و روش MCC (Maximal Clique Centrality) استفاده شد. تعداد ۱۰ ژن مهم و کلیدی که در شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین اهمیت داشتند، انتخاب و گزارش شدند. نرم‌افزار Cytoscape، یک نرم‌افزار منبع باز برای به

می‌یابد. در بررسی آن‌ها ۳۳ درصد از ژن‌هایی که بیان بالایی داشتند در مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و ۲۰ درصد آن‌ها در مسیرهای متابولیکی نقش داشتند.

اگرچه گیاهان همواره، تنش‌های زیستی و غیر زیستی متنوعی را تجربه می‌کنند، و در پاسخ به آن‌ها به روش‌های متفاوت و بر اساس مکانیسم‌های مولکولی مختلف عمل می‌کنند، اما هنوز شناخت کامل این روش‌های مولکولی میسر نشده است و نیازمند بررسی‌های فراوانی است. در این راستا مطالعات بیوانفورماتیکی و DNA نو ترکیب ابزارهای مؤثری را برای شناسایی بیشتر فرآیندهای پیچیده مولکولی فراهم آورده‌اند (Durrani *et al.*, 2020). با توجه به اهمیت نیتروژن در عملکرد برنج، بررسی نحوه تغییر بیان ژن‌ها و عملکرد بیولوژیکی دخیل در پاسخ گیاه به کمبود نیتروژن، می‌تواند موجب شناسایی ژن‌های کلیدی، عوامل تنظیمی مؤثر و مسیرهای مولکولی مهم درگیر در این فرآیند شود. بر همین اساس، پژوهش حاضر به منظور شناسایی بیشتر ژن‌ها، فرآیندهای زیستی و نحوه عملکرد برنج در پاسخ به تنش کمبود نیتروژن و بررسی شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین، طراحی شد.

## روش‌شناسی پژوهش

### انتخاب مجموعه داده

در این بررسی ابتدا با استفاده از کلیدواژه‌های تنش، کمبود نیتروژن و برنج جستجو در پایگاه داده NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) انجام شد. با توجه به میزان ارتباط مجموعه‌های داده با موضوع مورد نظر، نوع مطالعه، بافت مورد نظر و حداقل تکرار مورد نیاز در تیمار و کنترل، مجموعه داده ریزآرایه با شناسه GSE73772 انتخاب شد. این مجموعه داده مربوط به دو گروه کنترل و تیمار بود که هرکدام متشکل از سه تکرار بودند و نمونه‌گیری از گروه تیمار، شش ساعت پس از اعمال تنش کمبود نیتروژن بر ریشه گیاه برنج انجام شده بود. برای بررسی ژن‌های با بیان

<sup>5</sup> Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery

<sup>6</sup> Biological Process

<sup>7</sup> Molecular Function

<sup>8</sup> Cellular Component

<sup>1</sup> The National Center for Biotechnology Information

<sup>2</sup> Differentially Expressed Genes

<sup>3</sup> Box plot

<sup>4</sup> Volcano plot

treatment samples (six hours after Nitrogen deficiency stress shown in green including three samples with accession numbers GSM1902498, GSM1902499, and GSM1902500) in rice

در بررسی نتایج، ژن‌های با  $\text{adj } P\text{-value} < 0.05$

به‌عنوان ژن‌های با تفاوت بیان معنی‌دار شناسایی شدند (شکل ۲). در شکل نمودار آتشفشانی (شکل ۲)، ژن‌هایی که به رنگ قرمز مشخص شده‌اند، نسبت به حالت کنترل یا شاهد افزایش بیان و ژن‌هایی که به رنگ آبی مشخص شده‌اند نسبت به حالت کنترل کاهش بیان داشتند. نقاط با رنگ مشکی نیز مربوط به ژن‌هایی است که نسبت به حالت کنترل در شرایط تنش تغییر بیانی نداشتند. به عبارت دیگر، ژن‌های با رنگ آبی در شرایط کمبود نیتروژن نسبت به حالت کنترل، کمتر بیان شدند.

بیشترین افزایش بیان که با رنگ قرمز نشان داده شده و بالاترین نقطه نمودار است، مربوط به ژن Os03G0254200 با  $\log FC$  برابر با  $3/787$  و بیشترین کاهش بیان مربوط به ژن Os07g0142100 با  $\log FC$  برابر با  $-4/001$  می‌باشد.



**شکل ۲.** نمودار آتشفشانی مربوط به ژن‌های بیان شده در شش ساعت پس از اعمال تنش کمبود نیتروژن در برنج. ژن‌هایی که به رنگ قرمز مشخص شده‌اند، نسبت به حالت کنترل افزایش بیان و ژن‌هایی که به رنگ آبی مشخص شده‌اند نسبت به حالت کنترل کاهش بیان داشتند. نقاط با رنگ مشکی نیز مربوط به ژن‌هایی است که نسبت به حالت کنترل در شرایط تنش تغییر بیانی نداشتند.

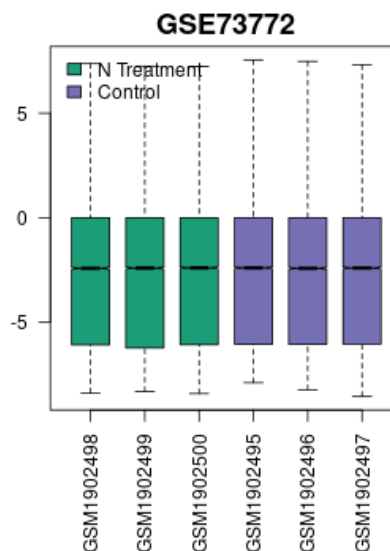
**Figure 2.** Volcano plot of expressed genes in six hours after nitrogen deficiency stress in rice. The genes marked in red increased and the genes marked in blue had a decreased expression compared to the control samples. The points with black color also correspond to the genes that had no change in expression compared to the control samples under stress conditions.

نمایش درآوردن شبکه‌های تعامل مولکولی و مسیره‌های زیستی و ادغام این شبکه‌ها می‌باشد. اگرچه Cytoscape خصوصاً برای تحقیقات زیستی طراحی شده است، اما به‌عنوان یک پلتفرم عمومی برای بررسی شبکه‌های پیچیده و تصویرسازی آن‌ها نیز می‌باشد (Saito *et al.*, 2012).

## یافته‌های پژوهش

### نتایج بررسی تفاوت بیان ژن‌ها

سه تکرار کنترل با سه تکرار تیمار تنش کمبود نیتروژن با استفاده از ابزار GEO2R مورد بررسی قرار گرفتند. پس از نرمال‌سازی اولیه داده‌ها، آنالیز تفاوت بیان ژن‌ها انجام شد و سپس نمودار جعبه‌ای ترسیم شد (شکل ۱). این نمودار که تیمارها را با رنگ سبز و کنترل را با رنگ بنفش نشان می‌دهد، حاکی از مشابه بودن میانه‌ها و چارک‌های مختلف نمونه‌ها است که قابل مقایسه بودن این دیتاها را میسر می‌نماید.



شکل ۱. نمودار جعبه‌ای توزیع نمونه‌های شاهد (رنگ بنفش شامل سه نمونه با کدهای دسترسی GSM1902495، GSM1902496 و GSM1902497) و تیمار شده (شش ساعت پس از اعمال تنش کمبود نیتروژن و به رنگ سبز شامل سه نمونه با کدهای دسترسی GSM1902498، GSM1902499 و GSM1902500) در برنج

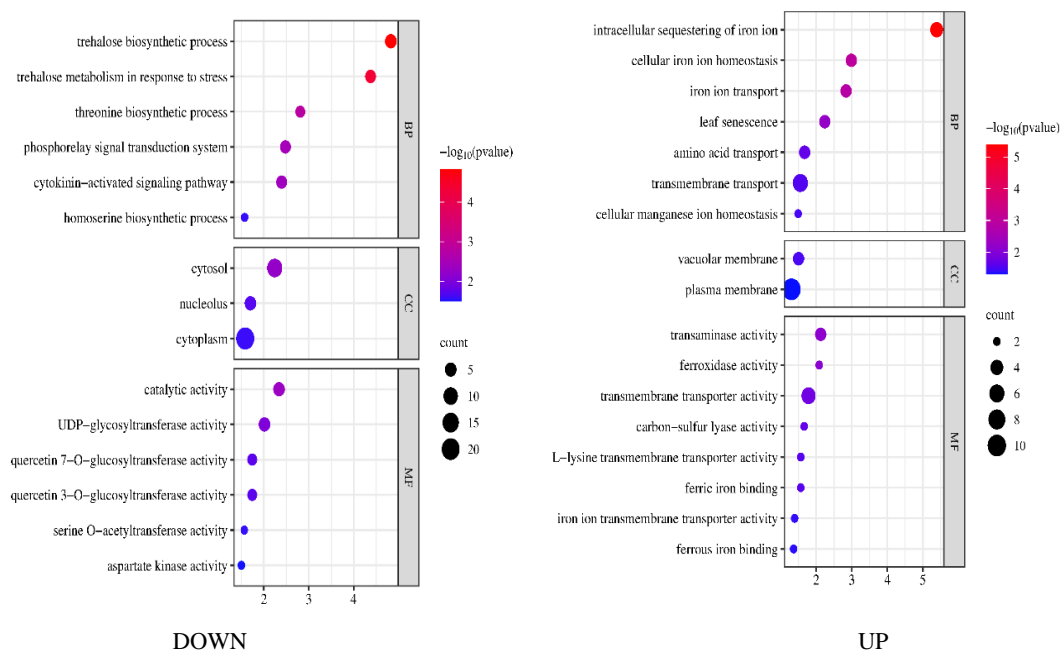
**Figure 1.** Box plot distribution of control (shown in purple including three samples with accession numbers GSM1902495, GSM1902496, and GSM1902497) and

فعال تری داشتند. همچنین بیان این ژن‌ها مرتبط با اجزای سلولی "غشای واکولار" و "غشای پلاسمایی" بود. عملکردهای مولکولی ژن‌های بیش‌تر بیان بیشتر مرتبط با "فعالیت ترانس آمیناز"، "فعالیت انتقال بین‌غشایی"، "فعالیت فرواکسیداز" و به‌طور کلی انتقال یون آهن بود. ژن‌هایی که کاهش بیان داشتند نیز در بخش فرآیند بیولوژیکی "بیوسنتز ترهالوز" و "متابولیسم ترهالوز در پاسخ به تنش نقش فعال‌تری از خود نشان دادند. سیتوزول معنی‌دارترین جز سلولی در بخش اجزای سلولی مرتبط با ژن‌هایی که کاهش بیان داشتند بود. همچنین این بررسی نشان داد ژن‌های با کاهش بیان، به‌طور معنی‌داری با بخش عملکردهای مولکولی، فعالیت کاتالیتیکی و به‌طور کلی فعالیت‌های گلیکوزیل ترانسفراز و گلوکوزیل ترانسفراز مرتبط بودند.

از میان ژن‌های بیان‌شده، ژن‌هایی که دارای خصوصیات  $|\log FC| \geq 1$  و  $P\text{-value} < 0.05$  بودند، به‌عنوان ژن‌های با بیان متفاوت (DEG) معنی‌دار انتخاب شدند. با توجه به نتایج، در مجموع تعداد ۳۹۵ ژن بیان متفاوت و معنی‌دار داشتند به طوری که در نمونه‌های تیمار نسبت به کنترل، ۱۲۱ ژن افزایش بیان (یا بیش بیان)<sup>۱</sup> و ۲۷۴ ژن کاهش بیان (یا کم بیان)<sup>۲</sup> از خود نشان دادند.

### بررسی هستی‌شناسی ژن‌ها و مسیرهای بیولوژیکی

هستی‌شناسی و مسیرهای عملکردی ژن‌های با بیان متفاوت معنی‌دار مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). براساس نتایج، ژن‌هایی که افزایش بیان داشتند به‌طور معنی‌داری در فرآیندهای بیولوژیکی "جداسازی داخل سلولی یون آهن"<sup>۳</sup>، "پایداری یون آهن سلولی" و "انتقال یون آهن" نقش



**شکل ۳.** نمودار حبابی هستی‌شناسی ژن‌های کاهش بیان‌یافته (سمت چپ) و نمودار حبابی هستی‌شناسی ژن‌های افزایش بیان‌یافته (سمت راست). ژن‌هایی که کاهش بیان داشتند بیشتر در فرآیند بیوسنتز ترهالوز و ژن‌هایی که افزایش بیان داشتند بیشتر در انتقال، پایداری و جداسازی سلولی یون آهن فعالیت دارند.

**Figure 3.** Ontology bubble chart DEGs of Down-regulated (left) and Up-regulated genes (right). Down-regulated genes had activity in trehalose biosynthetic process and Up-regulated genes had activity in intracellular sequestering, homeostasis and transport of iron ion

<sup>1</sup> Up-regulated

<sup>2</sup> Down-regulated

<sup>3</sup> Intracellular sequestering of iron ion

سرعت بخشیده و موجب کاهش کارایی دوره فرآوری کربن هر برگ و در نهایت کاهش انباشت محصولات فتوسنتزی می‌شود (Hou *et al.*, 2018).

نسبت متابولیسم‌های کربوهیدراتی به متابولیسم‌های نیتروژن در سلول، برای تنظیم رشد، نمو و عملکرد مهم می‌باشد. یانگ و همکاران (Yang *et al.*, 2015) نشان دادند در شرایط فراوانی آمونیم در ریشه، ژن‌های مرتبط با متابولیسم‌های آمینو اسید و کربوهیدرات کاهش بیان و در برگ افزایش بیان معنی‌دار داشتند. در شرایط نبود نیتروژن در ریشه، در مسیرها و متابولیسم‌های آمینواسیدی و کربوهیدرات، ژن‌ها کاهش بیان معنی‌داری از خود نشان دادند که در برگ‌ها و بخش هوایی گیاه منجر به کاهش متابولیسم‌های کربوهیدرات و نیتروژن شد. در شرایط کمبود نیتروژن، جذب آمونیم مورد نیاز به درستی انجام نمی‌شود و در نتیجه با محدود شدن آن به عنوان یک پیش ماده، موجب کاهش تولید گلوتامین و سایر اسیدآمینه‌های مرتبط با آن می‌شود (Yang *et al.*, 2015).

اهمیت نیتروژن در متابولیسم گیاه، در مطالعات مختلفی نشان داده شده است. مطابق گزارش Ueda *et al.* (2020) از جمله ژن‌های شناخته شده‌ای که در پاسخ به سطوح نیتروژن تنظیم می‌شوند ژن ساکارز سنتاز (*OsSUS1*: *Os06g0194900*) و *OsSUS2* (*Os03g0401300*) و همچنین ژن کدکننده فاکتور رونویسی ماریچ-حلقه-ماریچ *OsIRO2* (*Os01g0952800*) هستند که به نوبه خود بر متابولیسم کربوهیدرات و آهن در گیاهان تأثیر می‌گذارند.

نتایج ارائه شده در شکل ۳ نشان داد ژن‌های با افزایش بیان بیشتر تحت تنش کمبود نیتروژن، در مسیر انتقال یون آهن فعال هستند و در فرآیند پیری نقش دارند. تسریع فرآیند پیری سلولی و برگ‌ها در اثر تغییر میزان نیتروژن توسط توبوچی و همکاران (Tabuchi *et al.*, 2007)، هو و همکاران (Hou *et al.*, 2018)، و ذاکری و همکاران (Zakari *et al.*, 2020) گزارش شده است.

با بررسی مسیرهای مهم مرتبط با DEG‌ها که با استفاده از DAVID و در بخش KEGG انجام شد، در ژن‌های بیش‌باز مسیری معنی‌داری یافت نشد. اما نتایج حاصل از بررسی مسیرهای ژنی نشان داد، در شرایط کمبود نیتروژن بیشتر ژن‌های کم بیان، در فعالیت‌های بیوسنتز آمینواسیدها و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه نقش داشتند (شکل ۴). در حقیقت با اعمال تنش کمبود نیتروژن، کاهش معنی‌دار در بیان ژن‌های مسیرهای بیوسنتز مشاهده شد.

### شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین

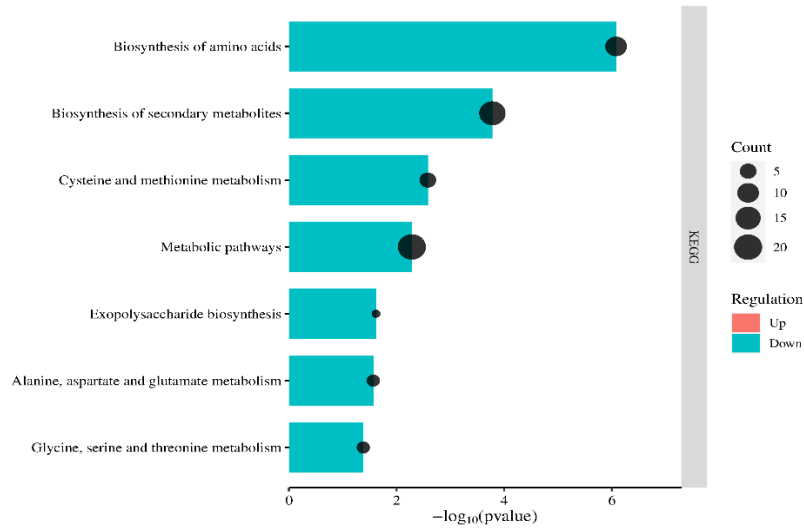
شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape رسم شد (شکل ۵). سپس تعداد ۱۰ ژن با استفاده از الگوریتم MCC انتخاب و به عنوان ژن‌های کلیدی در این شبکه معرفی شدند (شکل ۶). مهم‌ترین این ژن‌ها شامل *IRO2*، *IRT2* و *NRAMP1* بودند.

پیرامون ارتباط بین نیتروژن و فتوسنتز نشان داده شده است که بیش از نیمی از محتوای نیتروژن برگ به دستگاه فتوسنتزی اختصاص دارد. بررسی ضرایب همبستگی صفات مختلف، ارتباط خطی، مثبت و معنی‌دار بین هدایت روزنه‌ای، هدایت مزوفیلی و نرخ حداکثر انتقال الکترون و حداکثر فعالیت کربوکسیلازی روبیسکو با فرآوری کربن دی‌اکسید را نشان می‌دهد. مطالعه سازوکار اثر عناصر پر مصرف مانند نیتروژن و اثرات آن بر غلظت دیگر عناصر، واکنش گیاهان در مواجهه با تنش را تسهیل می‌کند. علاوه بر آن، تمام محدودیت‌های فتوسنتز به دلیل محدودیت‌های روزنه‌ای، مزوفیلی و بیوشیمیایی می‌باشد که تمامی این موارد به طور معنی‌داری تحت تأثیر کودهای نیتروژن و پتاسیم هستند. نیتروژن برای تولید پروتئین و تنظیم فعالیت آنزیمی ضروری است. در پژوهش حاضر نیز مشخص شد در اثر کمبود تأمین نیتروژن مورد نیاز گیاه، فعالیت یا مسیرهای بیوسنتزی مرتبط با تولید آمینواسیدها کاهش بیان داشتند. در نتیجه کمبود نیتروژن سبب کاهش فعالیت تثبیت کربن دی‌اکسید به وسیله آنزیم روبیسکو می‌شود. علاوه بر آن، کمبود نیتروژن فرآیند پیری برگ را

<sup>2</sup> Basic helix-loop-helix

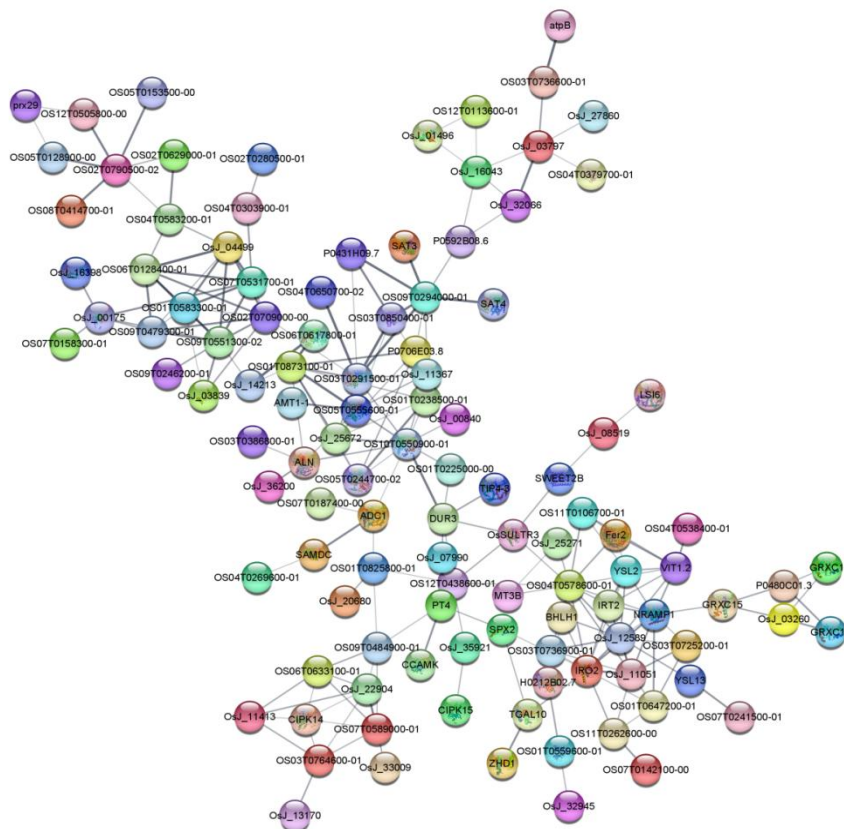
<sup>1</sup> Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes





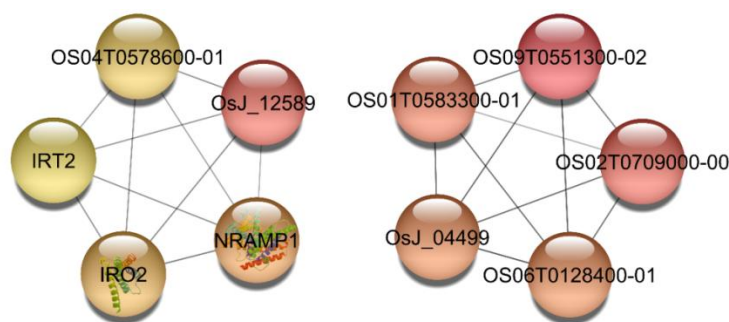
شکل ۴. مسیر های متابولیکی مربوط به ژن های کم بیان شش ساعت بعد از شروع تنش کمبود نیتروژن در برنج. بیشترین فعالیت متابولیکی مربوط به بیوسنتز آمینواسیدها می باشد

Figure 4. Metabolic pathways for down-regulated genes six hours after the beginning of nitrogen deficiency stress in rice. The highest metabolic activity is associated with amino acids biosynthesis



شکل ۵. شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین ژن های DEG در پاسخ به تنش کمبود نیتروژن برنج پس از شش ساعت

Figure 5. Protein-Protein interaction network DEGs in response to nitrogen deficiency stress in rice after 6 hours



شکل ۶. ده هاب ژن با بیان معنی‌دار در پاسخ به تنش کمبود نیتروژن برنج پس از شش ساعت  
**Figure 6.** Ten hub-genes in response to nitrogen deficiency stress in rice after 6 hours

شناسایی شده است. در گیاهان موتانت آرآییدوپسیس که این ژن به صورت خاموش بوده، اثرات شدید کاستی رشد در ریشه مشاهده شده که منجر به مرگ شده است. ریشه‌هایی که در *IRT1* موتاسیون دارند، در جذب آهن ضعف داشته و توانایی انباشت روی، کادمیوم و منگنز را در شرایط تنش آهن ندارند. در شرایط تنش کمبود آهن، فعالیت ژن‌های *IRT1*، *LeIRT1* و *LeIRT2* در گوجه‌فرنگی منجر به بازگرداندن و بهبود کاهش رشد می‌شوند.

علاوه بر آن، *IRT2* سیستم انتقالی دیگری می‌باشد که در فرآیند انتقال آهن نقش مهمی ایفا می‌کند که مانند *IRT1* کد کننده پروتئینی است که قادر به انتقال آهن و روی می‌باشد ولی توانایی انتقال کادمیوم و منگنز را ندارد. حوزه فعالیت *IRT2* همانند *IRT1* در ریشه بوده و میزان بیان آن ۲۰ مرتبه کمتر از *IRT1* می‌باشد. این ژن در حالت موتانت *IRT1* نمی‌تواند گیاه را از مرگ و کاهش شدید رشدی نجات دهد. همچنین جهش در *IRT1* منجر به کاهش معنی‌دار پارامترهای فتوسنتزی می‌شود و محصول آن به‌عنوان یک ترکیب پلی‌پپتیدی در دستگاه فتوسنتزی نقش دارد. مکانیسم گیاهان دانه‌ای در مواجهه با کمبود آهن به این گونه است که تولید ترکیبات کوچکی به نام فیتوسیدروفورها<sup>۲</sup> در گیاه افزایش می‌یابد. این ترکیب مسئول افزایش حلالیت پذیری آهن فریک می‌باشد. نشان داده شده که آنزیم‌های حاضر در مسیر بیوسنتزی این آنزیم به کمبود آهن حساس بوده و فعالیت آن‌ها افزایش

پایداری (هومئوستازی) آهن سلولی و تمام ارگانسیم‌های موجود، به منظور تأمین آهن کافی برای متابولیسم‌ها و جلوگیری از سطوح سمی آن، باید پایدار و متعادل باشد. برای دریافت آهن از محیط اطراف، این فلز باید از مسیرهای غشایی مختلف، مسیرهای درون سلولی عبور کرده و در ارگان‌ها و بافت‌های مختلف توزیع شود. چون حالت فریک آهن حلالیت بسیار پایینی دارد، دریافت و انتقال آهن نیازمند فرآیندهای به خصوصی (مانند عملیات کلاته کننده و احیا) می‌باشد. به دلیل پرسلولی بودن و تمایز یافته بودن بافت‌ها در گیاهان، فرآیندهای پیچیده‌ای به منظور پایداری آهن در گیاه رخ می‌دهد (Curie and Briat, 2003).

در شرایطی که کمبود آهن وجود دارد، فعالیت و بیان ژن‌های موجود در ریشه افزایش می‌یابد تا بتوانند آهن را از آهن فریک به فرو تبدیل کرده و جذب کنند. دلیل اسیدی شدن خاک نیز حاصل همین فعالیت می‌باشد و در پژوهش وایریچ و هم‌کاران (Wairich et al., 2019) به‌عنوان استراتژی شماره یک گیاهان یعنی استراتژی کاهش (به جز گیاهان خانواده گرامینه) از آن یاد شده است. بررسی‌های بیان ژن‌ها در آرآییدوپسیس منجر به شناسایی انتقال دهنده آهن فرو به نام *IRT1* شد. این ناقل که یک پلی‌پپتید ۳۴۷ آمینواسیدی با هشت لایه غشا فرضی بوده و در غشای پلاسمایی اپیدرم ریشه فعالیت می‌کند، یک کلاس جدیدی از ناقلان یون آهن در یوکاریوت‌ها است که مرتبط با خانواده ZIP بوده و در برنج، مخمر و نماتدها

<sup>2</sup> Phytosiderophores

<sup>1</sup> Reduction strategy

به طوری که در صورت کاربرد مقدار کم نیتروژن، غلظت آهن موجود در بافت در بیشترین مقدار بود. به عبارت دیگر هرچه غلظت نیتروژن موجود در خاک بیشتر باشد مقدار محتوای آهن بافت گیاه کمتر خواهد بود (Ethan et al., 2011).

نیتروژن می‌تواند با سخ فتو سنتز گیاه به تابش را تحت تأثیر قرار دهد (Sun et al., 2016). همچنین کمبود نیتروژن به طور معناداری باعث کاهش بازده کوانتومی فوتوشیمیایی مؤثر و حداکثر بازده کوانتومی فوتوشیمیایی می‌شود (Tantray et al., 2020).

Wen et al. (2019) نشان دادند با گذشت ۱۴ روز از اعمال تنش، بیان ژن‌های مهم و فعالیت آنزیمی افزایش یافته و فرآیندهای فرآوری نیتروژن را تحت تأثیر قرار می‌دهند. افزون بر آن، کمبود نیتروژن مانع انتقال ۵- آمینوبیلینیک اسید به پروفوبیلیوزن شده و سنتز پیش ساز کلروفیل را مهار می‌کند که فتوسنتز را تحت تأثیر خود قرار می‌دهد (Wen et al., 2019).

انتقال و جذب نیتروژن، چه به صورت نیترات یا آمونیوم، بر تعادل بار کلی و تعداد پروتون‌های درون سلول‌های گیاهی تأثیر می‌گذارد. این به این دلیل است که این فرآیندها یا پروتون‌ها را مصرف می‌کنند یا آزاد می‌کنند که منجر به تغییر در بار خالص سلول می‌شود. حفظ پایداری pH داخلی، که تحت تأثیر فرآیندهای مرتبط با نیتروژن است، برای توانایی گیاه در جذب و استفاده مؤثر نیتروژن بسیار مهم است. علاوه بر این، حفظ این تعادل به گیاهان کمک می‌کند تا در برابر تنش‌های غیر زنده مانند دماهای شدید، شوری و خشکی متحمل‌تر شوند (Feng et al., 2020).

در خانواده گرامینه استراتژی شماره دو گیاهان (استراتژی کلاته‌کنندگی)<sup>۲</sup> جهت مقابله با کمبود آهن به فعالیت و آزاد شدن فیتو سیدروفورها در ریزو سفر وابسته است. این ترکیب از فعالیت آمینواسیدهای تغییر یافته خانواده MAS<sup>۳</sup> به دست می‌آید و در پژوهش کوری و همکاران (Curie et al., 2003) نیز به آن اشاره شده

می‌یابد. به نظر می‌رسد پس از انتقال آهن از ریشه و آوندهای چوبی، واکوئل‌ها و میتوکندری‌های گیاهی مسئول نگهداری و انتقال آن به سایر نقاط مورد نیاز است. همچنین فعالیت *NRAMP* و نیکوتین آمید در غشای این اندامک‌ها جهت انتقال آهن و سایر عناصر مشاهده و گزارش شده است (Curie and Briat, 2003).

علاوه بر این، همکاری مشترک در جذب و استفاده از فسفر و نیتروژن در محصولات زراعی برای به دست آوردن تعادل مواد غذایی و رشد بهینه ضروری است. کمبود هم‌زمان نیتروژن و فسفر منجر به محدود شدن رشد و جذب سایر مواد مغذی می‌شود. علاوه بر آن، این کمبود توأم، یکسری واکنش‌های فیزیولوژیکی متفاوت و همچنین برخی فرآیندهای فیزیولوژیکی مشابه را تحریک می‌کند. با تمرکز بر ژن دخیل در عامل رونویسی (*NIGTI*) مشخص شده است که پروتئین بیان شده، یک تنظیم‌کننده مثبت برای هومئوستازی فسفر و تنظیم‌کننده منفی جذب نیتروژن در برنج است. این ژن باعث القا جذب فسفر و محدودیت در جذب نیتروژن شده و منجر به القای بیان ژن‌های مسئول فسفر و نیتروژن مانند *PTI*, *SPXI*, *NLP1* و *NRT2.1* می‌شود. همچنین کمبود نیتروژن رشد گیاه را شدیدتر از کمبود فسفر محدود و کنترل می‌کند (Wang et al., 2023).

چرخه آهن از مهم‌ترین عوامل کنترل میزان دسترسی آن برای فرآیندهای زیستی محسوب می‌شود. Chen et al. (2008) گزارش کردند در شرایطی که غلظت نیتروژن زیاد است، مقدار پلاک آهن روی ریشه نسبت به حالتی که مقدار آمونیاک طبیعی است، به طور معنی‌داری کمتر از ۵۰ درصد است. غلظت آر سنیک در ریشه و برگ‌های برنج همبستگی بالایی با مقدار پلاک آهن نشان داد. پژوهش آنها نشان داد چرخه آهن-نیتروژن در خاک شالیزار تأثیر زیادی بر تعادل میان آرسنیک و آهن در خاک دارد و متعاقباً میزان جذب آن‌ها توسط گیاه را تحت تأثیر خود قرار می‌دهد. در حقیقت، مدیریت نیتروژن به‌طور قابل‌توجهی بر محتوای آهن بافت گیاهی تأثیر می‌گذارد.

<sup>3</sup> Mugineic acid

<sup>1</sup> Bioavailability

<sup>2</sup> Chelation strategy

مورفولوژیکی افزایش نشان داد. گزارش شده است که کمبود نیتروژن از طریق ارتباط با متابولیسم‌های کربن، بر روی سنتز گلو تامات و گلو تامات دهیدروژناز، بر روی فعالیت فرآوری کربن و فعالیت فتوسنتزی برگ‌ها اثر معنی‌داری می‌گذارد. در بررسی شائو و همکاران (Shao *et al.*, 2020) نشان داده شد که با گذشت چهار هفته از اعمال تنش کمبود نیتروژن، برگ‌های پایینی گیاه برنج شروع به زرد شدن و کلروزه کرده و میزان وزن خشک گیاه کاهش و نسبت ریشه به برگ نیز افزایش یافت. بر اساس یافته‌های آن‌ها با اندازه‌گیری تبدلات گازی و کلروفیل a مشخص شد کاهش نیتروژن، فرآوری (اسیمیلاسیون) کربن‌دی‌اکسید را کاهش می‌دهد اما غلظت بین سلولی آن را افزایش می‌دهد. همچنین کمبود نیتروژن محتوای نشاسته، ساکارز و فروکتوز را افزایش، اما محتوای کل پروتئین محلول در برگ را تغییر نمی‌دهد.

بر اساس نتایج مندرج در شکل ۳، در پاسخ به تنش، ژن‌های مرتبط با بیوسنتز و تولید ترهالوز و ژن‌های دخیل در متابولیک ترهالوز کاهش بیان داشتند.

پژوهش وانگ و همکاران (Wang *et al.*, 2021) نیز نشان داد تحت شرایط کمبود نیتروژن، بیان ژن‌های دخیل در فرآیندهای سنتز کلروفیل، نمو کلروپلاست و واکنش در یافت نوری و انتقال الکترون در فوتوسیستم تغییر می‌یابند. همچنین با بیان معنی‌دار برخی ژن‌ها، سنتز آمینو اسیدها و انتقال پروتئین محدود شده و باعث کاهش میزان اورنیتین، سیتئین و تایروزین متابولوم‌ها می‌شوند. علاوه بر آن بررسی پروفایل آنالیز رونوشت‌ها (RNA-seq) نیز نشان داد، تحت کمبود نیتروژن، دانه گندم با افزایش مقدار آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، گالاکتوز و گلوکوز می‌تواند توانایی ویرایش DNA، جذب آهن، مقاومت به تنش‌های زنده و غیر زنده و تنش‌های اکسیداتیو را افزایش دهد.

پژوهش بورگس و همکاران (Burgos *et al.*, 2014) به بررسی نحوه سازگاری نوع خاصی از برنج با تنش نیتروژن پرداخت. نتایج نشان داد که ژن‌های کلیدی دخیل

است. فعالیت Mas منجر به تولید NAs<sup>1</sup> می‌شود که به‌وسیله انتقال گروه‌های آمینواسیدی نیکوتین آمین (NAAT) به 3-keto میانه تبدیل می‌شوند. همچنین، در شرایط کمبود آهن فاکتور رونویسی IRO2 به مقدار زیاد بیان می‌شود تا با افزایش ناقلان آهن در گیاه، عمل انتقال آهن به سرعت انجام شود. با افزایش بیان IRO2 و سایر فاکتورهای رونویسی، بیان ژن‌های مسئول انتقال آهن مانند IRT2، IRT1، YSL9 و NRAMP1 نیز افزایش می‌یابد (Wairich *et al.*, 2019).

در پژوهشی که به منظور بررسی کاربرد یون آهن در کارایی فتوسنتز انجام شد مشخص شد، با ایجاد تغییر در توالی ژن IRT1 سطوح رنگ‌دانه برگ و پروتئین‌های حاضر در غشای تیلاکوئید دچار تغییر شدند که منجر به تغییر در غلظت کل کلروفیل و ایجاد زردی رنگ برگ شد. همچنین علاوه بر آن، اندازه‌گیری نرخ شارش یا جریان فتوسنتزی در گیاهانی که واجد ژن IRT1 جهش‌یافته بودند، اختلال شدید در انتقال الکترون در فوتوسیستم دو را نشان داد (Varotto *et al.*, 2002). در برنج، عوا مل رونویسی IDEF2، IDEF1 و OsiIRO2 به‌طور مثبت و جزئی ژن‌های القاکننده کمبود آهن فریک، جذب آهن فرو و انتقال متقابل آهن را تنظیم می‌کنند (Kobayashi *et al.*, 2019).

در پژوهش حاضر، با توجه به اینکه داده‌ها مربوط به نمونه‌برداری در ساعات‌های اولیه تنش نیتروژن صورت گرفته بود، آنالیز داده‌ها، ژن‌ها و مسیرهای متابولیکی و انتقال یون‌ها را نشان دادند. در مطالعه‌ی کائی و همکاران (Cai *et al.*, 2012)، به منظور بررسی رونوشت‌های برنج در پاسخ به کمبود نیتروژن، ۱۰/۸۸ درصد از کل ژنوم بیان ژن داشتند که بیشتر در مسیرهای متابولیک سلولی، متابولیک‌های اولیه و ثانویه و همچنین انتقال مولکولی نقش داشتند. بر اساس نتایج، در ساعات‌های اولیه تنش نیتروژن، ابتدا ژن‌های مرتبط با عوامل رونویسی، کینازها و مسیرهای انتقال سیگنال افزایش بیان داشته و با افزایش مدت زمان تنش، بیان ژن‌های مرتبط با فرآیندهای متابولیکی، مسیرهای فیزیولوژیکی مرتبط با تغییرات

<sup>2</sup> Nicotianamine aminotransferase

<sup>1</sup> Nicotianamine synthase

شرایط خاک بر در دسترس بودن و شکل عناصری که گیاهان می‌توانند جذب کنند تأثیر می‌گذارد. تنش کمبود نیتروژن، با تغییر جذب آهن، به طور غیرمستقیم بر فتوسنتز و سایر پارامترهای فیزیولوژیکی تأثیر می‌گذارد. در نتیجه، گیاهان مسیرهایی را برای اطمینان از پایداری سلولی برای واکنش‌های بیوشیمیایی فعال می‌کنند و فعالیت و بیان ژن‌های مربوط به انتقال یون‌های فلزی و الکترون را افزایش می‌دهند. بدیهی است درک نقش عناصر مختلف و مسیرهای بیوسنتزی مرتبط با آن‌ها در شرایط تنش، بینش ارزشمندی را در مورد فیزیولوژی گیاه و در نهایت کشف راهکارهای مولکولی برای مقابله با آن ارائه می‌دهد. همچنین ژن‌های کلیدی معرفی شده در این پژوهش نقش مهمی در پاسخ گیاه به تنش کمبود نیتروژن دارد و می‌تواند در تبیین استراتژی‌های به‌نژادی به‌عنوان نشانگرهای زیستی در پاسخ به تنش کمبود نیتروژن در گیاه برنج مورد استفاده قرار گیرد.

## REFERENCES

- Burgos, N., Sales, M., Song, J., Ren, Y., & de los Reyes, B. (2014). N-starvation and supplementation in weedy red rice. *BioStudies, E-GEOD-59438*. Retrieved from <https://www.ebi.ac.uk/biostudies/arrayexpress/studies/E-GEOD-59438>.
- Cai, H., Lu, Y., Xie, W., Zhu, T., & Lian, X. (2012). Transcriptome response to nitrogen starvation in rice. *Journal of Biosciences*, 37, 731-747. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9242-2>
- Cao, P., Jung, K. H., Choi, D., Hwang, D., Zhu, J., & Ronald, P. C. (2012). The rice oligonucleotide array database: an atlas of rice gene expression. *Rice*, 5, 1-9. <https://doi.org/10.1186/1939-8433-5-17>
- Chaturvedi, I. (2005). Effect of nitrogen fertilizers on growth, yield and quality of hybrid rice (*Oryza sativa*). *Journal of Central European Agriculture*, 6(4), 611-618. <https://hrcak.srce.hr/17330>
- Chen, X. P., Zhu, Y. G., Hong, M. N., Kappler, A., & Xu, Y. X. (2008). Effects of different forms of nitrogen fertilizers on arsenic uptake by rice plants. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(4), 881-887. <https://doi.org/10.1897/07-368.1>
- Curie, C., & Briat, J. F. (2003). Iron transport and signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 183-206. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.135018>
- Dennis, G., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C., & Lempicki, R. A. (2003). DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biology*, 4, 1-11. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-9-r60>
- Durrani, I. S., Jan, A., Shah, S., Iqbal, A., Ahmad, D., Khan, H., & Naqvi, S. M. S. (2020). Bioinformatics studies of OSGLP8-12 gene from *oryza sativa* (japonica) reveal its role in conferring resistance against disease and stresses. *Pakistan Journal of Botany*, 52(2), 461-467. [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2020-2\(23](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2020-2(23)
- Ethan, S., Odunze, A. C., Abu, S. T., & Iwuafor, E. N. O. (2011). Effect of water management and nitrogen rates on iron concentration and yield in lowland rice. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 2(4), 622-629. [10.5251/abjna.2011.2.4.622.629](https://doi.org/10.5251/abjna.2011.2.4.622.629)
- Feng, H., Fan, X., Miller, A. J., & Xu, G. (2020). Plant nitrogen uptake and

در سازگاری به تنش نیتروژن، در جذب نیترات و سنتز ترهالوز نقش داشتند. آنالیز ترانسکریپتوم ریشه برنج تحت تنش کمبود نیتروژن توسط هشیه و همکاران (Hsieh et al., 2018) انجام شد. نتایج نشان داد که ژن‌های کلیدی دخیل در پاسخ به تنش کمبود نیتروژن بیشتر در مسیرهای مرتبط با متابولیسم، انتقال سیگنال هورمون گیاهی، و پاسخ‌های اکسیداتیو درگیر هستند.

## نتیجه‌گیری و پیشنهادها

یافته‌های این پژوهش نشان داد که تنش کمبود نیتروژن، موجب تغییر در بیان ژن‌های مرتبط با جذب و استفاده از عناصر کم‌مصرف مانند آهن می‌شود. این نتایج بیانگر این است که انتقال یون آهن نقش مهمی در حفظ ثبات برنج هنگام تنش کمبود نیتروژن ایفا می‌کند. همچنین تغییرات در

- assimilation: regulation of cellular pH homeostasis. *Journal of Experimental Botany*, 71(15), 4380-4392. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa150>
- Groen, S. C., Čalić, I., Joly-Lopez, Z., Platts, A. E., Choi, J. Y., Natividad, M., ... & Purugganan, M. D. (2020). The strength and pattern of natural selection on gene expression in rice. *Nature*, 578(7796), 572-576. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1997-2>
- Hsieh., P. H., Kan., C. C., Wu., H. U., Yang., H. C., & Hsieh M. H. (2018). Early molecular events associated with nitrogen deficiency in rice seedling roots.. *Scientific Reports*, 8(1), 12207-12207. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-30632-1>
- Hou, W., Yan, J., Jáklí, B., Lu, J., Ren, T., Cong, R., & Li, X. (2018). Synergistic effects of nitrogen and potassium on quantitative limitations to photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(20), 5125-5132. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01135>
- Huang, X., Zhang, Y., Wang, L., Dong, X., Hu, W., Jiang, M., ... & Wu, Y. (2021). OsDOF11 affects nitrogen metabolism by sucrose transport signaling in rice (*Oryza sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*, 12, 703034. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.703034>
- Imam, Y. (2017). Cereal Production. Shiraz, Shiraz University Press. (in Persian)
- Kobayashi, T., Nozoye, T., & Nishizawa, N. K. (2019). Iron transport and its regulation in plants. *Free Radical Biology and Medicine*, 133, 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.439>
- Li, Q., Lu, X., Wang, C., Shen, L., Dai, L., He, J., ... & Zeng, D. (2022). Genome-wide association study and transcriptome analysis reveal new QTL and candidate genes for nitrogen-deficiency tolerance in rice. *The Crop Journal*, 10(4), 942-951. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.12.006>
- Liang, T., Yuan, Z., Fu, L., Zhu, M., Luo, X., Xu, W., ... & Wu, X. (2021). Integrative transcriptomic and proteomic analysis reveals an alternative molecular network of glutamine synthetase 2 corresponding to nitrogen deficiency in rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7674. <https://doi.org/10.3390/ijms22147674>
- Nazish, T., Arshad, M., Jan, S. U., Javaid, A., Khan, M. H., Naeem, M. A., ... & Ali, M. (2021). Transporters and transcription factors gene families involved in improving nitrogen use efficiency (NUE) and assimilation in rice (*Oryza sativa* L.). *Transgenic Research*, 1-20. <https://doi.org/10.1007/s11248-021-00284-5>
- Sabouri, H. S. M. Hosseini. (2017). Rice. Gonbad Kavous. Gonbad Kavous University Press and Noruzi. (in Persian)
- Saito, R., Smoot, M. E., Ono, K., Ruschinski, J., Wang, P. L., Lotia, S., ... & Ideker, T. (2012). A travel guide to Cytoscape plugins. *Nature Methods*, 9(11), 1069-1076. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2212>
- Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M., ... & Lohmann, J. U. (2005). A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nature Genetics*, 37(5), 501-506. <https://doi.org/10.1038/ng1543>
- Shao, C.-H., Qiu, C.-F., Qian, Y.-F., & Liu, G.-R. (2020). Nitrate deficiency decreased photosynthesis and oxidation-reduction processes, but increased cellular transport, lignin biosynthesis and flavonoid metabolism revealed by RNA-Seq in *Oryza sativa* leaves. *PLoS One*, 15(7), e0235975. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235975>
- Sherman, B. T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M. W., Lane, H. C., ... & Chang, W. (2022). DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W216-W221. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac194>
- Sun, J., Ye, M., Peng, S., & Li, Y. (2016). Nitrogen can improve the rapid response of photosynthesis to changing irradiance in rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Scientific Reports*, 6(1), 31305. <https://doi.org/10.1038/srep31305>
- Sun, L., Di, D. W., Li, G., Li, Y., Kronzucker, H. J., & Shi, W. (2020). Transcriptome analysis of rice (*Oryza sativa* L.) in response to ammonium resupply reveals the involvement of phytohormone signaling

- and the transcription factor OsJAZ9 in reprogramming of nitrogen uptake and metabolism. *Journal of Plant Physiology*, 246, 153137. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153137>
- Tabuchi, M., Abiko, T., & Yamaya, T. (2007). Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2319-2327. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm016>
- Tantray, A. Y., Bashir, S. S., & Ahmad, A. (2020). Low nitrogen stress regulates chlorophyll fluorescence in coordination with photosynthesis and Rubisco efficiency of rice. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26, 83-94. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00721-0>
- Ueda, Y., Ohtsuki, N., Kadota, K., Tezuka, A., Nagano, A. J., Kadowaki, T., ... & Yanagisawa, S. (2020). Gene regulatory network and its constituent transcription factors that control nitrogen-deficiency responses in rice. *New Phytologist*, 227(5), 1434-1452. <https://doi.org/10.1111/nph.16627>
- Varotto, C., Maiwald, D., Pesaresi, P., Jahns, P., Salamini, F., & Leister, D. (2002). The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 31(5), 589-599. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01381.x>
- Wairich, A., de Oliveira, B. H. N., Arend, E. B., Duarte, G. L., Ponte, L. R., Sperotto, R. A., ... & Fett, J. P. (2019). The combined strategy for iron uptake is not exclusive to domesticated rice (*Oryza sativa*). *Scientific Reports*, 9(1), 16144. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52502-0>
- Wang, D., Xu, T., Yin, Z., Wu, W., Geng, H., Li, L., ... & Lian, X. (2020). Overexpression of *OsMYB305* in rice enhances the nitrogen uptake under low-nitrogen condition. *Frontiers in plant science*, 11, 369. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00369>
- Wang, F., Wang, Y., Ying, L., Lu, H., Liu, Y., Liu, Y., ... & Mao, C. (2023). Integrated transcriptomic analysis identifies coordinated responses to nitrogen and phosphate deficiency in rice. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1164441. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1164441>
- Wang, L., Xie, W., Chen, Y., Tang, W., Yang, J., Ye, R., ... & Zhang, Q. (2010). A dynamic gene expression atlas covering the entire life cycle of rice. *The Plant Journal*, 61(5), 752-766. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04100.x>
- Wang, Y., Wang, D., Tao, Z., Yang, Y., Gao, Z., Zhao, G., & Chang, X. (2021). Impacts of nitrogen deficiency on wheat (*Triticum aestivum* L.) grain during the medium filling stage: transcriptomic and metabolomic comparisons. *Frontiers in Plant Science*, 12, 674433. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.674433>
- Wang, Y., Zhang, P., Li, M., Guo, Z., Ullah, S., Rui, Y., & Lynch, I. (2020). Alleviation of nitrogen stress in rice (*Oryza sativa*) by ceria nanoparticles. *Environmental Science: Nano*, 7(10), 2930-2940. <https://doi.org/10.1039/D0EN00757A>
- Wen, B., Li, C., Fu, X., Li, D., Li, L., Chen, X., ... & Gao, D. (2019). Effects of nitrate deficiency on nitrate assimilation and chlorophyll synthesis of detached apple leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 142, 363-371. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.07.007>
- Yang, S. Y., Hao, D. L., Song, Z. Z., Yang, G. Z., Wang, L., & Su, Y. H. (2015). RNA-Seq analysis of differentially expressed genes in rice under varied nitrogen supplies. *Gene*, 555(2), 305-317. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.11.021>
- Yeger-Lotem, E., Sattath, S., Kashtan, N., Itzkovitz, S., Milo, R., Pinter, R. Y., ... & Margalit, H. (2004). Network motifs in integrated cellular networks of transcription-regulation and protein-protein interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(16), 5934-5939. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306752101>
- Zakari, S. A., Asad, M. A. U., Han, Z., Zhao, Q., & Cheng, F. (2020). Relationship of nitrogen deficiency-induced leaf senescence with ROS generation and ABA concentration in rice flag leaves. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39, 1503-1517. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10128-x>