نهمین کنفرانس ملی و اولین کنفرانس بین‌المللی فیزیولوژی گیاهی
9th National and 1st International Conference of Plant Physiology
۲۷-۲۹ بهمن ۱۴۰۴، دانشگاه گیلان

بررسی رویدادهای Alternative Splicing در مرکبات آلوده به بیماری میوه سبز و برهمکنش با miRNAها

علی عباسی[1*]، فاطمه فاریابی[2] ، بهروز خلیل طهماسبی[1] ، زهرا عباسی[3]
آدرس نگارنده اول: بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی جنوب کرمان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، جیرفت، ایران
آدرس نگارنده دوم: اگرواکولوژی، کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جیرفت، جیرفت
آدرس نگارنده سوم: علوم و صنایع غذایی،کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، سبزوار

چکیده

بیماری گرینینگ مرکبات (HLB)که توسط باکتری Candidatus Liberibacter asiaticus (CLas) ایجاد می‌شود، درک مکانیسم‌های مولکولی پاسخ میزبان، به ویژه در سطح تنظیم پس از رونویسی، برای یافتن راهکارهای مقابله حیاتی است. این مطالعه با هدف انجام یک بررسی سیستماتیک از تغییرات پیرایش جایگزین (AS) در سطح ژنوم در پاسخ به آلودگی مزمن CLas انجام شد. با تحلیل مجدد داده‌های RNA-Seq دو ژنوتیپ مقاوم و حساس مرکبات در مرحله ۴۸ هفته پس از آلودگی، ۲۰۱ ژن منحصربه‌فرد با الگوهای AS تغییریافته شناسایی شد. نتایج نشان داد عفونت باعث بازبرنامه‌ریزی کیفی چشم‌انداز AS می‌شود؛ به طوری که تنها ٪۲۳ از ژن‌های تحت تأثیر بین گیاهان سالم و آلوده مشترک بودند. این یافته‌ها نقش محوری AS را در پاسخ پیچیده مرکبات به HLB برجسته کرده و ژن‌های کاندیدای ارزشمندی را برای مطالعات آینده و توسعه استراتژی‌های مدیریت بیماری معرفی می‌کند.

مقدمه

بیماری گرینینگ مرکبات (میوه سبز مرکبات) یا (HLB)مخرب‌ترین بیماری مرکبات در جهان است. اگرچه مطالعات ترانسکریپتومیک متعددی تغییرات گسترده بیان ژن را در بافت‌های آلوده گزارش کرده‌اند ، اما تغییرات در لایه پیرایش جایگزین (AS) که می‌تواند بدون تغییر در سطح رونوشت اصلی، عملکرد پروتئین را دگرگون کند، کمتر مورد توجه قرار گرفته است. AS یک مکانیسم کلیدی تنظیم پس از رونویسی در یوکاریوت‌هاست که از طریق تولید چندین ایزوفرم رونوشتی و پروتئینی از یک ژن، به گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی کمک می‌کند. شواهد نشان می‌دهد بیمارگرهای گیاهی می‌توانند الگوهای جهانی AS میزبان را برای دستکاری متابولیسم و سیستم ایمنی آن تغییر دهند. این مطالعه با هدف پر کردن این شکاف دانشی، به بررسی سیستماتیک، کمی و جامع تغییرات AS در مرکبات آلوده به CLasمی‌پردازد.

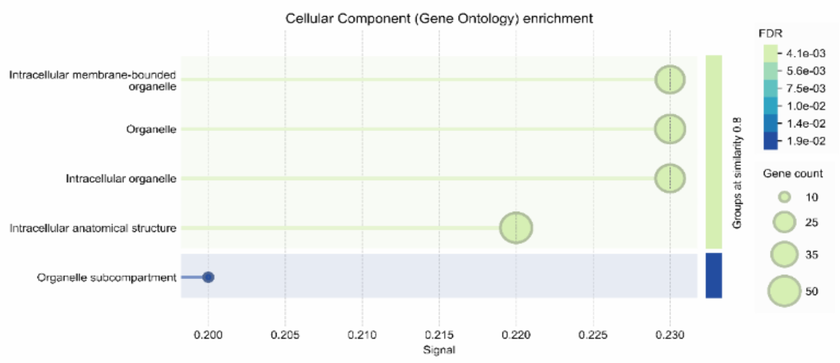
مواد و روش‌ها

داده‌های خام توالی‌یابی RNA مورد استفاده در این مطالعه مربوط به دو گونه مرکبات شامل یک گونه مقاوم (*citrus maxima*) و یک گونه حساس (*citrus reticulata*) به بیماری گرینینگ مرکبات میباشد، که از پایگاه داده‌های توالی‌یابی NCBI (SRA) با شماره دسترسی (BioProject PRJNA941950) قابل دسترسی هستند (Gao *et al.*, 2023). خوانش‌های FASTQ پس از کنترل کیفیت و حذف آداپتور، با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbenchبه ژنوم مرجع Citrus clementina همتراز شدند. رویدادهای AS با استفاده از ماژول اختصاصی نرم‌افزار شناسایی و تحلیل شدند. برای اطمینان از صحت آماری رویدادهای شناسایی‌شده، سطح معناداری تغییرات در فراوانی ایزوفرم‌ها بین نمونه‌های سالم و آلوده با استفاده از آزمون آماری دقیق فیشر و با p-value کمتر از ۰،۰۵ محاسبه گردید. علاوه بر این، رویدادهایی که توسط حداقل ۱۰ خوانش پشتیبانی شده و دارای یک قاب خوانش باز (ORF) معنی‌دار با طول حداقل ۲۰۰ جفت باز بودند، برای تحلیل‌های بعدی انتخاب شدند(Ghorbani et al., 2019) . بنابراین، تمامی ادعاهای مطرح‌شده در این مطالعه مبنی بر وجود تغییرات کیفی و بازبرنامه‌ریزی چشم‌انداز ASناشی از آلودگی بهHLB ، بر اساس معیارهای آماری قوی و قابل اتکا استوار است. کلیه آنالیزهای بعدی شامل ترسیم نمودار ون، بررسی توزیع انواع رویدادهای AS، نقشه‌یابی کروموزومی و آنالیز غنی‌سازی عملکردی (GO)با استفاده از کدنویسی در محیط Google Colabو به کمک کتابخانه‌های پایتون (مانند matplotlib, seaborn, gffutils) انجام شد. برای آنالیز GO، از پایگاه داده STRINGو ژنوم *C. clementina*به عنوان مرجع استفاده گردید (Ghorbani *et al.*, 2019). برای شناسایی miRNAهای تنظیم‌کننده ژن‌های دارای الگوی پیرایش جایگزین (AS) در مرکبات، از یک رویکرد چندمرحله‌ای استفاده شد.

توالی‌های miRNAبالغ گیاه *Citrus clementina*از پایگاه داده miRBase (نسخه ۲۲.۱) استخراج شد. سپس، برهمکنش‌های احتمالی بین این miRNAها و توالی‌های mRNAژن‌های کاندیدای تحت ASبا ابزار آنلاین psRNATargetپیش‌بینی شد. نتایج به‌دست‌آمده برای ترسیم شبکه برهمکنش miRNA-mRNAدر نرم‌افزار Cytoscape به‌کار رفت و امکان شناسایی miRNAهای کلیدی تنظیم‌کننده بیان ایزوفرم‌های مختلف فراهم آمد (Ghorbani *et al.*, 2019).

نتایج و بحث

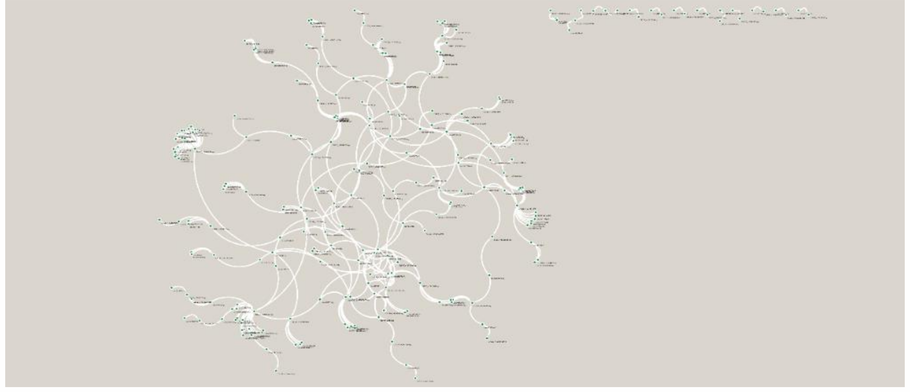
در مجموع، ۲۰۱ ژن منحصربه فرد با الگوهای ASتغییریافته شناسایی شدند. ۷۸ ژن (٪۳۹) منحصراً در گیاهان سالم (کنترل) تحت ASقرار داشتند. ۷۷ ژن (٪۳۸) منحصراً در گیاهان آلوده (CR48) تحت ASقرار داشتند. تنها ۴۶ ژن (٪۲۳) در هر دو شرایط مشترک بودند. این الگو حاکی از یک بازبرنامه‌ریزی عمیق و خاص-شرایط در ماشین پیرایش گیاه در پاسخ به عفونت مزمن است. آنالیز GOژن‌های دارای splicingجایگزین (AS) تغییریافته در گیاهان آلوده، غنی‌سازی معناداری را در سه دستهٔ اصلی نشان داد: اجزای سلولی مانند غشای پلاسمایی، دیواره سلولی و کمپلکس‌های پروتئینی بزرگ غشایی(شکل۱)؛ فرآیندهای بیولوژیک شامل پاسخ به تنش، پاسخ به محرک‌های خارجی و فرآیندهای متابولیک؛ و عملکردهای مولکولی از جمله فعالیت آنزیمی، اتصال به پروتئین و اتصال به یون‌ها. این الگوی غنی‌سازی حاکی از آن است که splicingجایگزین به‌طور هدفمند ژن‌های دخیل در حفظ یکپارچگی ساختاری سلول، فرآیندهای سیگنالینگ و پاسخ به تنش را تحت تأثیر قرار می‌دهد.



شکل(۱)- آنالیز GOژن‌های دارای splicingجایگزین

تفسیر بیولوژیکی برهمکنش‌های کلیدی ژنهای AS شده با miRNA ها شامل موارد زیر است. ۱- برهمکنش miR156-SPL (تنظیم فاز رشدی و پاسخ به تنش) ۲- برهمکنش miR172-AP2 (تنظیم گلدهی) ۳- برهمکنش miR396-GRF (تنظیم رشد و تکثیر سلولی)(شکل۲).

این مطالعه نشان داد که پیرایش جایگزین، یک لایه تنظیمی محوری و پویا در تعامل مرکبات با باکتری CLasاست. آلودگی منجر به یک بازبرنامه‌ریزی کیفی گسترده در الگوهای ASمی‌گردد که ژن‌های کلیدی درگیر در یکپارچگی سلولی، سیگنالینگ و متابولیسم اولیه را هدف قرار می‌دهد.



شکل(۲)-برهمکنش‌های کلیدی ژنهای AS شده با miRNA ها

منابع

Gao C, Li C, Li Z, Liu Y, Li J, Guo J, Mao J, Fang F, Wang C, Deng X and Zheng Z (2023) Comparative transcriptome profiling of susceptible and tolerant citrus species at early and late stage of infection by "*Candidatus* Liberibacter asiaticus". Front. Plant Sci. 14:1191029. doi: 10.3389/fpls.2023.1191029

Ghorbani, A., Tahmasebi, A., Izadpanah, K. et al. Genome-Wide Analysis of Alternative Splicing in Zea mays during Maize Iranian Mosaic Virus Infection. Plant Mol Biol Rep 37, 413–420 (2019). https://doi.org/10.1007/s11105-019-01169-y