

شناسایی ژن‌های کلیدی در گیر در رسیدگی میوه لیموترش با استفاده از واکاوی داده‌های ریز آرایه^۱

Identification of Key Genes Involved in Lemon (*Citrus limon*) Fruit Ripening using Microarray Data Analysis

زهرا زینتی* حسین امین و سیما سازگاری^۲

چکیده

طی دهه‌های اخیر تلاش‌های متعددی به منظور تشریح مولکولی مکانیسم‌های اساسی رسیدن میوه انجام شده است. درک جامع شبکه تنظیمی رسیدگی در تنظیم کیفیت میوه، تغییر زمان رسیدگی و افزایش ماندگاری حائز اهمیت می‌باشد. در پژوهش حاضر، با توجه به ارزش غذایی و دارویی لیموترش، داده‌های ریز آرایه مربوط به بافت این میوه در دو مرحله نموی نارس و بلوغ، با هدف شناسایی مسیرها و ژن‌های مرتبط با رسیدن، توسط نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک از جمله بسته DAVID، STRING و iTAK مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه‌ها نشان داد تعداد ۴۲۵۵ پروپست در مرحله نموی رسیده نسبت به نارس افتراق بیان نشان دادند. یکی از مسیرهای غنی شده KEGG توسط این پروپست‌ها، مسیر کاروتنوئید بود. با توجه به افزایش بیان ژن‌های مسیر زیست‌ساخت کاروتنوئید در مرحله رسیدگی و نقش این مسیر در بیوسنتز آبسزیک اسید (ABA)، می‌توان بیان داشت سوخت و ساز و علامت‌دهی ABA نقش کلیدی در رسیدگی میوه لیموترش دارد. افزون بر این، افزایش بالای رونوشت‌های ژن‌های کلیدی درگیر در مسیر زیست‌ساخت اتیلن در مرحله رسیدگی، می‌تواند مؤید نقش اتیلن و مسیر انتقال پیام آن در رسیدگی این میوه باشد. بر اساس نتایج پژوهش حاضر ژن رمزکننده آنزیم ۱-آمینو سیکلو پروپان کربوکسیلات اکسیداز ۱ (1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1) دارای بیشترین افزایش بیان (۱۳/۰۵ برابر) در مرحله رسیدگی در مقایسه با میوه نارس لیموترش بود. جستجو برای تعیین عوامل رونویسی با افزایش بیان منجر به شناسایی ۴۱ عامل رونویسی شد. هم‌چنین واکاوی شبکه مرتبط با ژن‌های با افزایش بیان، منتج به شناسایی ۱۰ ژن به‌عنوان نقاط کلیدی شبکه از جمله عامل رونویسی HY5-like گردید. دست‌ورزی ژن‌های معرفی شده می‌تواند یکی از راهکارهای بهبود متابولیت‌های ثانویه و تغییر زمان رسیدگی میوه لیموترش باشد که در صورت موفقیت، به تولید ارقامی با زمان رسیدگی مطلوب می‌انجامد که می‌توانند در مناطق مختلف مورد کشت قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: واکاوی مسیر KEGG، رونوشت، شبکه ژن، مرکبات، عوامل رونویسی.

مقدمه

رسیدن میوه یک فرایند نموی است که به شکل پیچیده‌ای توسط شبکه‌ای هماهنگ در چندین سطح تنظیم می‌شود و برخی از جنبه‌های این فرآیند هنوز نیاز به بررسی و پژوهش بیشتر دارد. رسیدن میوه که به طور هم‌افزایی توسط فرآیندهای نموی و عوامل مختلف محیطی تنظیم می‌شود، شامل فرآیندهای به هم پیوسته‌ای از جمله انباشت رنگدانه، افزایش اندازه، نرم شدن و تعدیل قند، پی‌اچ، مواد فرار معطر و متابولیت‌های تغذیه‌ای است که به طور مستقیم با کیفیت نهایی میوه در ارتباط می‌باشند

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۱۰

۱- تاریخ دریافت: ۹۹/۷/۲۶

۲- به ترتیب استادیار اصلاح نباتات، بخش اگرواکولوژی، استادیار علوم باغبانی، بخش تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی داراب و دانش-آموخته دکتری بخش زیست فناوری، دانشکده کشاورزی شیراز، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (Zahra.Zinati@gmail.com).

(۱۹). بنابراین، درک جامع شبکه تنظیمی نه تنها از نظر زیستی جالب است بلکه برای تنظیم کیفیت میوه و افزایش ماندگاری نیز مهم است (۳).

با توجه به اهمیت زیستی و ارزش تجاری میوه‌ها، طی دهه‌های اخیر تلاش‌های متعددی به منظور تشریح مولکولی مکانیسم‌های اساسی رسیدن میوه انجام شده است. تشریح مولکولی مکانیسم‌های مرتبط با فرایند رسیدن، شامل یک شبکه متشکل از هورمون‌ها، تنظیم کننده‌های رونویسی، تغییرهای اپی‌ژنومی و سایر عناصر تنظیمی می‌باشد که به طور مستقیم کیفیت میوه تازه و کیفیت پس از برداشت را زیر تاثیر قرار می‌دهد. در این زمینه، بسیاری از اجزای مولکولی مرتبط با تجمع رنگدانه، سوخت و ساز دیواره یاخته‌ای، سوخت و ساز کربوهیدرات‌ها، بیوسنتز اتیلن و انتقال پیام، از راه تغییر در بیان آن‌ها در گیاهان تراریخته و یا جهش‌های طبیعی شناسایی شده‌اند (۱۹). با این وجود، مکانیسم‌های رسیدگی در میوه‌هایی با الگوی تنفسی متفاوت، ممکن است یکسان نباشد (۴).

لیموترش (*Citrus limon*) گونه‌ای با ویژگی‌های ارزشمند غذایی، دارویی و آرایشی می‌باشد (۱۴). با این وجود اطلاعات جامعی در رابطه با نمو میوه لیموترش و ژن‌های مرتبط با رسیدن میوه که می‌تواند خواص ارزشمند این میوه را زیر تاثیر قرار دهد، وجود ندارد. در این راستا، مطالعه رونوشت نمو میوه در مرکبات توسط واکاوی ریزآرایه، امکان تجزیه و تحلیل ژرف‌تر نمو میوه را فراهم نموده است. گزارش‌های متعددی پیرامون کاربرد روش‌های بررسی رونوشت‌ها در مطالعه‌های کارکردی ژنوم گیاهان گوناگون و بررسی الگوی بیان ژن‌ها در شرایط مختلف وجود دارد. در همین زمینه، واکاوی رونوشت پرتقال (*Citrus sinensis*) نشان داده است که گروه‌های کارکردی بیوسنتز دیواره یاخته‌ای، سوخت و ساز کربوهیدرات و اسید سیتریک، سوخت و ساز کاروتنوئید و نیز پاسخ به تنش، از جمله فرآیندهای درگیر در نمو و رسیدن میوه می‌باشند (۳۵).

واکاوی ترانسکریپتوم میوه توت‌فرنگی در مراحل رسیدگی نشان داد که گروه‌های کارکردی مختلفی از جمله سوخت و ساز قندها، سوخت و ساز انرژی، مسیرهای هورمونی و تولید رنگدانه‌ها در رسیدگی میوه نقش موثری دارند. این مطالعه‌ها همچنین نشان دادند که کاهش بیان ژن پیرووات دهیدروژناز با افزایش مقدار قندها و همچنین هورمون آبسزیک اسید (ABA) منجر به افزایش سرعت رسیدگی میوه توت‌فرنگی می‌شود (۳۲). همچنین واکاوی ترانسکریپتوم مقایسه‌ای هندوانه در سه مرحله مختلف رسیدگی نشان داد که مسیرهای بیوسنتز کارتنوئیدها، هورمون‌ها و قندها (ساکارز، نشاسته و گالاکتوز)، مسیرهای اصلی غنی شده به وسیله ژن‌های با بیان افتراقی می‌باشند و ژن‌های اصلی موثر در رسیدگی میوه در این مسیرها قرار دارند. افزون بر این، با توجه به نتیجه‌ها، ژن‌های رمزکننده عوامل رونویسی MYB و bHLH و AP2 نیز از جمله ژن‌های مهم موثر در رسیدگی هندوانه محسوب می‌شوند (۳۹).

واکاوی داده‌های رونوشت دو نژادگان پرتقال در مراحل مختلف نمو میوه نشان داد که ژن ساکارز فسفات سنتاز یک ژن کلیدی مسئول در فرآیند نمو میوه می‌باشد و بیان آن با گذشت مراحل رسیدگی افزایش می‌یابد. همچنین ۱۱ ژن افتراقی متفاوت مربوط به مرحله ابتدایی رسیدگی میوه در مسیر فلاونوئیدها غنی شدند. افزون بر این، ژن‌های مهم مربوط به مسیر آمینوبوتیریک اسید در نژادگان پرتقال خونی بیان افتراقی دارند (۳۱).

با توجه به ارزش غذایی و دارویی لیموترش، در پژوهش حاضر به مقایسه بافت این میوه در دو مرحله نمو نارس و بلوغ، با هدف شناسایی مسیرها و ژن‌های مرتبط با رسیدن با استفاده از واکاوی ریزآرایه و تجزیه و تحلیل مسیرهای غنی شده KEGG با پروب‌ست‌های دارای بیان افتراقی پرداخته شد. همچنین، از آنجا که عوامل رونویسی به عنوان نقاط کلیدی شبکه‌های تنظیمی محسوب می‌شوند، جستجو برای شناسایی این عوامل در میان ژن‌های دارای بیان افتراقی، با استفاده از پایگاه‌های داده‌ای سایت tTAK صورت گرفت. افزون بر این، واکاوی شبکه ژنی به منظور یافتن ژن‌های کلیدی با استفاده از STRING و نرم افزار Cytoscape انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری، کنترل کیفیت و پیش‌پردازش داده‌های ریزآرایه Affymetrix

داده‌های ریزآرایه بیان ژن لیموترش وارسته Frost Lisbon با شماره دسترسی GSE12804 از مخزن GEO پایگاه داده NCBI دریافت شد (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). در این آزمایش RNA استخراج شده از بافت وزیکول آب میوه در دو مرحله نمو (نارس و بلوغ)، با سه تکرار زیستی مورد مقایسه قرار گرفت (۱).

فراست لیسبون یک لیموی اسیدی می‌باشد. در آزمایش مورد بررسی میزان pH میوه فراست لیسبون در حالت نارس و رسیده به ترتیب ۳/۶ و ۳/۵ بود. درست زمانی که میوه‌ها شروع به انباشت آب کردند به‌عنوان میوه نارس جمع آوری شدند که در این زمان اندازه میوه ۳۳×۲۹ میلی‌متر بود. میوه‌های رسیده کامل آبدار بودند و اندازه آن‌ها در زمان نمونه‌گیری ۴۸×۵۱ میلی‌متر بود. پیش‌پردازش و نرمال‌سازی داده‌های خام با استفاده از نرم افزار Expression Console مربوط به شرکت Affymetrix (<http://www.affymetrix.com>) و الگوریتم RMA انجام شد (۹).

شناسایی پروب‌های با افتراق بیان

واکاوی بیان افتراقی ژن‌ها، بین بافت‌های بالغ و نابالغ با استفاده از بسته limma توسط نرم افزار R انجام شد (۲۵). به منظور شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی از آزمون Bayesian t-test با $P\text{-value} < 0.1$ adjusted استفاده شد.

شناسایی مسیرهای غنی شده KEGG با پروب‌های دارای بیان افتراقی

برای اطلاعات دقیق‌تر در مورد مسیرهای مرتبط با ژن‌های دارای بیان افتراقی، تجزیه و تحلیل مسیرهای غنی شده KEGG (Kyoto Encyclopedia Genes and Genomes) با استفاده از پایگاه داده DAVID v6.8 انجام شد (<https://david.ncicfcrf.gov/>) (۱۲). در این راستا، مسیرهای دارای $P\text{-value} < 0.05$ به عنوان مسیرهای معنی‌دار گزارش شدند.

شناسایی عوامل رونویسی مرتبط با رسیدگی

برای شناسایی عوامل رونویسی با افزایش بیان، توالی‌های پروتئینی مرتبط با پروب‌های دارای بیان افتراقی در مقابل توالی عوامل رونویسی موجود در پایگاه‌های داده سایت iTAK (<http://itak.feilab.net/cgi-bin/itak/index.cgi>) بلاست شدند. لازم به ذکر است که توالی‌های پروتئینی مربوط به پروب‌ها، از پایگاه داده STRING نسخه 11.0 (<https://string-db.org/>) دریافت گردید.

شبکه برهمکنش ژنی و شناسایی ژن‌های کلیدی شبکه

پایگاه داده STRING نسخه 11.0 (<https://string-db.org/>) به عنوان ابزار جستجو، برای بازیابی برهمکنش ژن‌های با افزایش بیان استفاده شد. در مرحله بعد، تمام برهمکنش‌های موجود در شبکه، در نرم افزار Cytoscape بارگذاری شدند (۲۶). سپس Cyto-Hubba، به عنوان یک افزونه Cytoscape، برای یافتن ژن کلیدی توسط الگوریتم‌های مختلف واکاوی توپولوژیک مانند Betweenness, Bottleneck, Closeness, ClusteringCoefficient, Degree, DMNC, EcCentricity, EPC, MCC, MNC, Radiality و Stress مورد استفاده قرار گرفت (۶).

نتایج

شناسایی پروب‌های با افتراق بیان

بر اساس نتیجه‌های حاصل از آزمون Bayesian t-test مشخص گردید از میان ۱۶۳۸۲ پروب‌ست مورد بررسی، تعداد ۴۲۵۵ پروب‌ست دارای بیان افتراقی بودند که تعداد ۲۰۲۴ پروب‌ست، کاهش بیان و نیز تعداد ۲۲۳۲ پروب‌ست، افزایش بیان در مرحله نمری رسیده را در مقایسه با نارس نشان دادند.

شناسایی مسیرهای غنی شده KEGG با پروب‌های دارای بیان افتراقی

واکاوی مسیرهای غنی شده KEGG بیانگر این بود که ژن‌های با بیان افتراقی در مسیرهای زیست‌ساخت متابولیت‌های ثانویه (cit01110)، بیوسنتز اسید آمینه‌ها (cit01230)، سوخت و ساز آرژنین و پرولین (cit00330)، سوخت و ساز کربن (cit01200)، مسیرهای متابولیکی (cit01100)، سوخت و ساز فنیل آلانین (cit00360)، انتقال پیام هورمون گیاهی (cit04075)، بیوسنتز پانتوتنات و COA (cit00770)، سوخت و ساز آلانین، آسپاراتات و گلوتامات (cit00250)، بیوسنتز آنتوبیوتیک‌ها (cit01130)، سوخت و ساز سیستئین و متونین (cit00270)، بیوسنتز کاروتنوئید (cit00906)، و طول‌سازی اسید چرب (cit00062) قرار داشتند (جدول ۱). در این راستا، بیشترین سهم با تعداد ۲۱۴، ۱۴۱ و ۵۴ ژن، به ترتیب به مسیرهای متابولیکی (cit01100)، مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه (cit01110) و بیوسنتز آنتوبیوتیک‌ها (cit01130) اختصاص یافت (جدول ۱).

جدول ۱- نتیجه‌های واکاوی غنی‌سازی مسیر KEGG توسط پروپست‌های با بیان افتراقی.

Table 1. Results of enrichment analysis of KEGG pathway by differential expressed probe sets.

مسیر KEGG KEGG pathway	تعداد ژن Gene count	P-Value
cit01110:Biosynthesis of secondary metabolites	141	4.59E-04
cit01230:Biosynthesis of amino acids	36	0.002183
cit00330:Arginine and proline metabolism	13	0.005839
cit01200:Carbon metabolism	37	0.00731
cit01100:Metabolic pathways	214	0.009444
cit00360:Phenylalanine metabolism	12	0.010027
cit04075:Plant hormone signal transduction	34	0.012224
cit00770:Pantothenate and CoA biosynthesis	8	0.015776
cit00250:Alanine, aspartate and glutamate metabolism	10	0.018262
cit01130:Biosynthesis of antibiotics	54	0.024922
cit00270:Cysteine and methionine metabolism	15	0.039626
cit00906:Carotenoid biosynthesis	9	0.048391
cit00062:Fatty acid elongation	7	0.050303

شناسایی عوامل رونویسی مرتبط با رسیدگی

جستجو برای تعیین عوامل رونویسی با افزایش بیان بالا، منجر به شناسایی ۴۱ ژن مختلف گردید و در این زمینه، خانواده‌های NAC، bZIP و MYB-related به ترتیب با ۴، ۳ و ۳ عامل رونویسی، بیشترین تعداد عوامل رونویسی را به خود اختصاص دادند. فهرست عوامل رونویسی با افزایش بیان بیش از دو برابر و اطلاعات مربوط به خانواده آن‌ها در جدول ۲ ارائه شده است.

شبکه برهمکنش ژنی و شناسایی ژن‌های کلیدی

لازم به ذکر است تعداد ژن‌های موجود در شبکه، تعداد ارتباطات و P -value شبکه به ترتیب شامل ۱۰۸۷، ۱۶۰۷ و $4/36e^{-07}$ بود. واکاوی شبکه توسط Cyto-Hubba منتج به شناسایی ۱۰ ژن کلیدی در شبکه گردید که دستکم توسط دو الگوریتم شناسایی شدند. لیست ژن‌های کلیدی در جدول ۳ ارائه شده است. به طور جالب توجهی عامل رونویسی HY5-transcription factor، به عنوان یکی از عوامل رونویسی شناسایی شده، جزء ژن‌های کلیدی شبکه نیز بود.

جدول ۲- فهرست عوامل رونویسی با بیش از دو برابر افزایش بیان در میوه‌های لیموترش رسیده نسبت به نارس.

Table 2. List of transcription factors with more than 2-fold increase in expression in the mature vs. immature lemon fruits

شماره شناسایی	نام ژن	تغییرهای بیان	خانواده
پروب ست Probe set	پروتئین Protein accession	Fold change	Family
Cit.10465.1.S1_s_at; Cit.30576.1.S1_s_at	XP_006475902.1	9.41185	HSF
Cit.12189.1.S1_s_at; Cit.4169.1.S1_at	XP_006494895.1	5.7794	HB-BELL
Cit.25299.1.S1_at	XP_006472692.1	4.4238	B3-ARF
Cit.12214.1.S1_s_at	XP_006485436.1	4.0156	NAC
Cit.31333.1.S1_at	XP_006479647.1	3.9479	HSF
Cit.22874.1.S1_at	XP_006477628.1	3.8032	C2H2
Cit.5041.1.S1_s_at	XP_006465679.1	3.4483	HB-HD-ZIP
Cit.14155.1.S1_s_at	XP_006487112.1	3.2635	bZIP
Cit.20608.1.S1_at	XP_006486372.1	2.7547	MYB
Cit.13265.1.S1_at	XP_006483336.1	2.6965	bZIP
Cit.3970.1.S1_s_at	XP_006480596.1	2.5686	NF-YB
Cit.15253.1.S1_s_at	XP_006466888.1	2.5635	MADS-MIKC
Cit.31124.1.S1_at	XP_006492427.1	2.4448	WRKY
Cit.1579.1.S1_at	XP_006478113.1	2.4109	MYB-related
Cit.16636.1.S1_at	XP_006490017.1	2.3892	AP2/ERF-ERF
Cit.24864.1.S1_s_at	XP_006473054.1	2.3376	Trihelix
Cit.1497.1.S1_s_at	XP_006479050.1	2.2626	NAC
Cit.5733.1.S1_at	XP_006487722.1	2.0899	MYB

بحث

نتیجه‌های حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که یکی از مسیرهای غنی شده KEGG، مسیر بیوسنتز آنتوبیوتیک‌ها بود (جدول ۱). در تایید این یافته، خواص درمانی لیموترش شامل فعالیت‌های ضدالتهابی، ضد میکروبی، ضد سرطانی و آنتی پارازیتی اثبات شده است (۱۴). به طور قابل توجه، یکی از مسیرهای غنی شده در پژوهش حاضر، مسیر کاروتنوئید بود که ۹ ژن را در بر می‌گرفت (جدول ۴). در همین راستا، گزارش‌های متعددی مبنی بر بیوسنتز کاروتنوئید در طی فرایند رسیدگی میوه مرکبات ارائه شده است (۸، ۲۰). لازم به ذکر است بیوسنتز کاروتنوئید و چرخه گزانتوفیل به عنوان مسیرهای متابولیکی بالادست سوخت و ساز هورمون اسید آسبیزیک اسید (ABA)، نقش قابل ملاحظه‌ای در پویایی یاخته‌ای ABA دارند (۳۱) و این هورمون نقش کلیدی در رسیدن میوه‌های نافرزاگرا دارد. در واقع سطح هورمون ABA یاخته‌ای در میوه توسط بیوسنتز، کاتابولیسم و فعال‌سازی مجدد ABA تعیین می‌شود. در همین راستا گزارش شده است که هورمون ABA طیف پیچیده‌ای از فعالیت‌های متابولیکی از جمله تخلیه آوند آبکش از مواد فتوسنتزی^۲ و نیز بیوسنتز ترکیب فنیل پروپانوئید را در زمان رسیدن میوه، تعدیل می‌نماید (۱۱، ۳۱). در پژوهش حاضر بیان ژن رمز کننده ۹-سیس-اپوکسی کاروتنوئید دی اکسیژناز ۲ در میوه رسیده لیموترش در مقایسه با میوه نارس، به میزان ۲/۳۷ برابر افزایش یافت (جدول ۴). در تایید این یافته، Jia و همکاران (۱۰) گزارش کردند که سرکوب سیس-اپوکسی کاروتنوئید دی اکسیژناز، به عنوان آنزیمی که در بیوسنتز ABA نقش دارد، منجر به تأخیر در رسیدن میوه توت فرنگی گردیده است. هم‌چنین، Wang و همکاران (۳۱) نشان دادند که رسیدن میوه هندوانه به طور قابل توجهی با تجمع ABA در ارتباط است که ممکن است توسط ژن‌های سنتز و کاتابولیسم ABA مانند *CINCEs* و *CICYP707As* تنظیم شود. هم‌چنین، در پژوهش حاضر بیان ژن رمز کننده فیتوئن سنتاز در میوه رسیده لیموترش در مقایسه با میوه نارس، ۱/۹۴ برابر افزایش یافت (جدول ۴). بر اساس گزارش‌های Wang و همکاران (۳۱)، افزایش بیان *CIPSYI* (Cl97C01G008760) در بافت میوه هندوانه شیرین با افزایش تجمع لیکوپن ارتباط مثبت دارد که این ممکن است به افزایش کل کاروتنوئید در طی رسیدن این میوه کمک نماید (۳). از آنجا که مسیر بیوسنتز کاروتنوئید در بالادست بیوسنتز ABA عمل می‌کند، تجمع کاروتنوئید و بیوسنتز ABA ممکن است به طور هم‌افزایی روند رسیدن در میوه هندوانه را زیر تأثیر قرار دهند (۳۹). با توجه به افزایش بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز کاروتنوئید در مرحله رسیدگی و هم‌چنین نقش این مسیر در بیوسنتز ABA پیشنهاد می‌شود که سوخت و ساز و پیام‌دهی ABA نقش قابل ملاحظه‌ای در رسیدگی میوه لیموترش دارد.

متابولیت‌های ثانویه مربوط به عطر و طعم میوه، به طور خاص در مرحله بالاتر بلوغ میوه، در آن ساخته و انباشته می‌شوند که این متابولیت‌ها تأثیر به‌سزایی در ارتقاء سطح سلامت مصرف کننده فراهم می‌کنند. با این وجود، مطالعه‌های اندکی در این زمینه صورت گرفته است. تشریح بیشتر اجزای تنظیم کننده زیست‌ساخت، انباشت و سوخت و ساز این متابولیت‌ها ممکن است چشم‌انداز جدیدی را برای درک رسیدن میوه و حفظ کیفیت آن باز کند (۳). در پژوهش حاضر بر اساس نتیجه‌های واکاوی مسیر، یکی از مسیرهایی که توسط پروب‌های دارای بیان افتراقی غنی شد، مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه بود که در این مسیر، ژن رمز کننده آنزیم ۱-آمینو سیکلو پروپان کربوکسیلات (ACC) اکسیداز ۱ (ACO1)، دارای بیشترین افزایش بیان (۱۳/۰۵ برابر) در مرحله رسیدگی در مقایسه با میوه نارس لیموترش بود (جدول ۵). این آنزیم یکی از آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز اتیلن است و پیام‌رسانی^۳ اتیلن سهم مهمی در رسیدن میوه دارد. نکته جالب توجه دیگر در پژوهش حاضر این بود که دیگر ژن‌های موجود در مسیر تولید اتیلن نیز دارای بیان افتراقی بودند (جدول ۵). مرکبات جزء میوه‌های نافرزاگرا هستند که بدون افزایش سریع در تولید اتیلن و سرعت تنفس، بالغ می‌شوند (۱۸). بر این اساس، تصور می‌شود که رسیدن در میوه‌های نافرزاگرا، مستقل از اتیلن باشد. با این حال، مشخص شده است که اتیلن برای رسیدگی میوه‌های نافرزاگرا نیز ضرورت دارد (۱۸). به طوری که تیمار اتیلن با تسریع در تنفس و انگیزش تغییرهای رنگدانه‌ای پوست از جمله بیوسنتز کاروتنوئید، رسیدن مرکبات را تسریع کرده است (۷). آنزیم‌های S-آدنوزیل متیونین سنتتاز، ۱-آمینو سیکلو پروپان کربوکسیلات (ACC) سنتاز (ACS) و ACC اکسیداز (ACO) از جمله آنزیم‌های درگیر در مسیر

بیوسنتر اتیلن می‌باشند (۱۸). نتیجه‌های پژوهش‌ها حاکی از آن است که ACS و ACO که جزء آنزیم‌های اصلی برای کنترل میزان بیوسنتر اتیلن هستند، توسط خانواده‌های چند ژنی رمز می‌شوند (۲۳، ۳۶). به عنوان مثال، در گوجه‌فرنگی چهارده ژن رمزکننده ACS و شش ژن رمزکننده ACO شناسایی شده که در میان آن‌ها دو ژن رمزکننده ACS و یک ژن رمزکننده ACO مسئول تولید اتیلن می‌باشند. در پژوهش حاضر نیز مشخص گردید که دو ژن رمزکننده ACO و دو ژن رمزکننده ACS در مرحله رسیدگی میوه لیموترش در مقایسه با میوه نارس، افتراق بیان داشتند (جدول ۵). هم‌چنین نتیجه‌ها نشان داد که بیان ژن ACO1 به میزان ۱۳/۰۵ برابر و هم‌چنین بیان ژن‌های رمزکننده شبه ACS1 و شبه ACS به ترتیب به میزان ۵/۴۳۴۳ و ۲/۱۲۶۵ برابر افزایش یافت. در حالی که بیان ژن ACO به کمتر از نصف کاهش یافت (جدول ۵). در پژوهش حاضر، نتیجه‌های حاصل از واکاوی رونوشت لیموترش، افزایش بالای رونوشت‌های ژن‌های مسیر بیوسنتر اتیلن را نشان داد که می‌تواند مؤید نقش اتیلن و مسیر انتقال پیام اتیلن در رسیدگی میوه لیموترش باشد. در همین راستا، در انگور که یک میوه نافرزا است، رونوشت ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های بیوسنتر اتیلن، شامل ACS و ACO پیش از شروع رسیدگی میوه به بالاترین مقدار خود رسیدند (۵، ۲۴). میوه‌های نافرزا مانند پرتقال می‌توانند در کل دوره رشد میوه و به میزان کمی اتیلن تولید نمایند و تیمار اتیلن، زرد شدن میوه را تسریع می‌کند (۱۳). بر اساس یافته‌های Zhang و همکاران (۳۷)، در طول رسیدن میوه، آبسزیک اسید در تلاقی با اتیلن می‌باشد و از راه افزایش فعالیت آنزیم‌های بیوسنتر اتیلن (ACS و ACO) و انباشت پیش‌ساز اتیلن (ACC)، در تنظیم رسیدگی میوه شرکت می‌نماید. در مجموع، بر اساس نتیجه‌های به دست آمده از پژوهش حاضر چنین به نظر می‌رسد که هر دو مسیر پیام‌رسانی اتیلن و ABA در نمو و رسیدگی میوه لیموترش نقش کلیدی دارند. افزون بر این، در میان ژن‌های موجود در مسیرهای غنی شده، تعدادی ژن مرتبط با اسیدهای آلی از جمله فومارات هیدراتاز ۱، فسفوانول پیرووات کربوکسیلاز، گلی‌اگزالات/ سوکسینیک سمی‌آلدهید ردوکتاز ۲ و شبه پراکسیزومال (S)-۲-هیدروکسی اسید اکسیداز وجود داشت که بیان آن‌ها در مرحله بلوغ نسبت به مرحله نارس به ترتیب ۱/۶۷، ۱/۷۴، ۲/۷۶ و ۳/۴۳ برابر افزایش یافت. آنزیم‌های فومارات هیدراتاز ۱ و فسفوانول پیرووات کربوکسیلاز از آنزیم‌های کلیدی مرتبط با چرخه اسید سیتریک و آنزیم‌های گلی‌اگزالات/ سوکسینیک سمی‌آلدهید ردوکتاز ۲ و شبه پراکسیزومال (S)-۲-هیدروکسی اسید اکسیداز از آنزیم‌های کلیدی سوخت و ساز گلی‌اکسالات و دی کربوکسیلات هستند. فسفوانول پیرووات کربوکسیلاز، اگزوالوستیک اسید را برای چرخه اسید سیتریک تولید می‌کند (۳۸). در تایید نتیجه‌های پژوهش حاضر، نقش احتمالی فسفوانول پیرووات کربوکسیلاز در تجمع اسید آلی در هلو گزارش شده است (۲۲).

جدول ۳- فهرست ژن‌های کلیدی موجود در شبکه مرتبط با ژن‌های دارای افزایش بیان که دستکم توسط دو الگوریتم شناسایی شدند.

Table 3. List of key genes in the network of upregulated genes identified by at least two algorithms.

الگوریتم‌های مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های کلیدی Algorithms used to identify key genes	شماره شناسایی پروتئین Protein accession	پروب ست Probe set	نام پروتئین Protein name
Betweenness, BottleNeck, Closeness, Degree, EPC, MNC, Radiality, Stress	XP_006473486.1	Cit.29499.1.S1_s_at	Glucose-6-phosphate isomerase, cytosolic-like
Closeness, Degree, EPC, EcCentricity, MNC, Radiality, Stress	XP_006475593.1	Cit.10135.1.S1_s_at	Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic-like
Betweenness, BottleNeck, Closeness, Degree, Radiality, Stress	XP_006468099.1	Cit.4430.1.S1_s_at	Translocation protein SEC63 homolog
Betweenness, BottleNeck, Closeness, Degree, Radiality	XP_006469783.1	Cit.18337.1.S1_at	Uncharacterized LOC102621250
BottleNeck, Closeness, EPC, MNC, Radiality	XP_006480011.1	Cit.12547.1.S1_at	Fumarate hydratase 1, mitochondrial-like
Degree, EPC, MNC	XP_006486589.1	Cit.14368.1.S1_at	Glutamate--tRNA ligase, chloroplastic/mitochondrial-like
Betweenness, BottleNeck	XP_006467893.1	Cit.28258.1.S1_at	Anaphase-promoting complex subunit 4-like
Betweenness, Stress	XP_006483336.1	Cit.13265.1.S1_at	Transcription factor HY5-like
DMNC, MCC	XP_006479564.1	Cit.25302.1.S1_s_at	Bet1-like SNARE 1-1-like
EPC, MNC	XP_006470964.1	Cit.11709.1.S1_s_at	Probable glutamate--tRNA ligase, cytoplasmic-like

جدول ۴- ژن‌های درگیر در مسیر زیست‌ساخت کاروتنوئید.

Table 4. Genes involved in carotenoid biosynthesis.

پروب ست Probe set	نام ژن Gene name	تغییرهای بیان Fold change
CIT.17235.1.S1_S_AT, CIT.29734.1.S1_S_AT	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 2	2.3721
CIT.14835.1.S1_AT	Indole-3-acetaldehyde oxidase-like	0.5057
CIT.19346.1.S1_AT	Abcisic acid 8'-hydroxylase 4-like	1.7385
CIT.29769.1.S1_S_AT	Prolycopene isomerase, chloroplastic	1.7659
CIT.37992.1.S1_AT	Abcisic acid 8'-hydroxylase 3-like	1.8977
CIT.13178.1.S1_S_AT	Capsanthin/capsorubin synthase, chromoplastic	1.9183
CIT.9344.1.S1_S_AT	Beta-carotene hydroxylase	2.049
CIT.11366.1.S1_AT	Phytoene synthase	1.9437
CIT.11407.1.S1_AT	Zeaxanthin epoxidase, chloroplastic	2.6855

جدول ۵- ژن‌های درگیر در مسیر زیست‌ساخت اتیلن.

Table 5. Genes involved in ethylene biosynthesis pathway.

پروب ست Probe set	نام ژن Gene name	تغییرهای بیان Fold change
CIT.1718.1.S1_S_AT	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1(ACO1)	13.05
CIT.18037.1.S1_AT	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 1-like (ACS1-like)	5.4343
CIT.2568.1.S1_AT	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase-like (ACS1-like)	2.1265
CIT.30357.1.S1_AT	S-adenosylmethionine synthase 3	0.5887
CIT.30535.1.S1_S_AT, CIT.21723.1.S1_S_AT	ACC oxidase (ACO)	0.34805

آنزیم فومارات هیدراتاز ۱ یکی از اجزای مهم چرخه اسید سیتریک می‌باشد و واکنشی که طی آن فومارات به ملات تبدیل می‌شود را کاتالیز می‌کند (۳۰). افزون بر این، پژوهش‌ها نشان می‌دهند که ژن‌ها و آنزیم‌های مربوط به مسیر سوخت و ساز گلی اکسالات در طول مراحل نمو و رسیدگی میوه دستخوش تغییرهای قابل توجهی می‌شوند (۲). واکاوی پروتئومیکس و متابولومیکس گوجه‌فرنگی در مراحل مختلف رسیدگی میوه نشان داد که مسیر سوخت و ساز گلی اکسالات از جمله مسیرهای مهم و معنی‌داری است که در طی نمو میوه بر اساس واکاوی داده‌ها به وسیله پروتئین‌های مختلف غنی شده است (۲۸). در پژوهش حاضر، میزان بیان ژن رمز کننده شبه پراکسیزومال (S)-۲-هیدروکسی اسید اکسیداز در مرحله رسیدگی میوه افزایش یافته است. Lee و همکاران (۲۰۰۷) نیز نشان دادند که میزان بیان این ژن حتی در مراحل ابتدایی رسیدگی میوه سبب تا حد ۳/۸ برابر افزایش یافته است (۱۶). شناسایی عوامل رونویسی مرتبط با رسیدگی به درک مکانیسم‌های رسیدگی میوه کمک می‌کند. عوامل رونویسی فرآیند رسیدگی میوه را تقویت یا سرکوب می‌کنند (۳۳). در پژوهش حاضر، جستجو برای تعیین عوامل رونویسی با افزایش بیان، منتج به شناسایی ۴۱ ژن مختلف گردید که ۱۸ عامل رونویسی، بیش از دو برابر افزایش بیان نشان دادند (جدول ۲) که متعلق به خانواده‌های مختلفی از جمله HSF, NAC, bZIP, MYB, MADS-MIKK و WRKY بودند. در تأیید نتیجه‌های پژوهش حاضر، گزارش‌های مختلفی نشان داده‌اند که این خانواده‌ها در رسیدگی دخالت دارند. به عنوان مثال عامل رونویسی WRKY که از انگور جدا شده بود، رونویسی ACS و تولید اتیلن در گیاه آرابیدوپسیس را افزایش داد (۲۱). هم‌چنین، مشخص شده است که عوامل رونویسی NAC مانند SINAC4 و SINAC9 نقش مهمی در بیوسنتز، درک و پیام‌رسانی اتیلن در رسیدن میوه گوجه‌فرنگی ایفا می‌کنند (۱۵). افزون بر این، در پژوهش Terol و همکاران (۲۹) گزارش شده است که عوامل رونویسی متعلق به خانواده‌هایی نظیر NAC و bHLH در کنترل

رسیدن میوه نارنگی نقش به سزایی دارند. مطالعه‌های پویش کل ژنومی روی نارنگی، منجر به شناسایی ۱۸ ژن HSF گردیده است (۱۷). هم‌چنین، واکاوی بیان ژن در پرتقال، ۱۴ ژن HSF را به عنوان تنظیم‌کننده‌های فرآیند نمو و رسیدگی میوه معرفی نموده است (۱۷). تنظیم‌کننده‌های CrHsfB2a و CrHsfB5 از جمله مهمترین تنظیم‌کننده‌های سیترات، در طی فرآیند تخریب سیترات در طول مراحل نمو میوه و هم‌چنین هوای گرم می‌باشند (۱۷).

در پژوهش حاضر نیز چهار عامل رونویسی مانند heat shock factor protein HSF30-like (متعلق به خانواده HSF)، BEL1-like homeodomain protein 1-like (متعلق به خانواده HB-BELL) و auxin response factor 17-like (متعلق به خانواده B3-ARF) و NAC domain-containing protein 78-like (متعلق به خانواده NAC) به ترتیب با افزایش ۹/۴۱، ۵/۷۷ و ۴/۰۱ برابری، بیشترین افزایش مقدار بیان را نشان دادند (جدول ۲). هم‌چنین، یکی از عوامل رونویسی شناسایی شده، عامل رونویسی transcription factor HY5-like بود که بر اساس نتیجه‌های واکاوی شبکه به عنوان یکی از ژن‌های کلیدی شبکه تنظیمی رسیدگی لیموترش عمل می‌کند (جدول ۳). در پژوهشی Shin و همکاران (۲۷) گزارش کردند که LONG HYPOCOTYL5 (HY5) مرتبط با عوامل رونویسی bZIP است که نقش مثبتی در ریخت‌زایی نوری و پیام‌رسانی هورمونی دارد.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر منجر به شناسایی مسیرهای زیستی از جمله بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و انتقال پیام هورمون گیاهی، تعدادی ژن مرتبط با چرخه اسید سیتریک و سوخت و ساز گلی اکسالات و دی کربوکسیلات، عوامل رونویسی از جمله BEL1-like homeodomain protein 1-like و auxin response factor 17-like و NAC domain-containing protein 78-like و هم‌چنین ژن‌های کلیدی شبکه تنظیمی نمو لیموترش از جمله HY5-like گردید. هم‌چنین، با توجه به افزایش بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز کاروتنوئید و اتیلن به نظر می‌رسد هر دو مسیر پیام‌رسانی اتیلن و ABA نقش‌های مهمی در شبکه تنظیمی رسیدگی در لیموترش را به خود اختصاص دهند. مسیرها و ژن‌های شناسایی شده در این پژوهش می‌توانند هدف‌های مناسبی برای بررسی دقیق‌تر کارکرد آن‌ها در نمو و رسیدگی میوه لیموترش باشند و راه را برای درک بهتر جزئیات فرآیند رسیدگی هموارتر سازند. دست‌ورزی ژن‌هایی که در این پژوهش معرفی شدند با توجه به میزان بیان و کارکردی که در فرآیند نمو دارند، می‌تواند یکی از راهکارهای بهبود متابولیت‌های ثانویه و تغییر زمان رسیدگی باشد که در صورت موفقیت به تولید ارقامی با زمان رسیدگی مطلوب می‌انجامد که می‌توانند در مناطق مختلف مورد کشت قرار گیرند.

References

1. Aprile, A., C. Federici, T.J. Close, L. De Bellis, L. Cattivelli and M.L. Roose. 2011. Expression of the H⁺-ATPase AHA10 proton pump is associated with citric acid accumulation in lemon juice sac cells. *Funct. Integr. Genomics*. 11(4): 551-563.
2. Baqui, S.M., A.K. Mattoo and V.V. Modi. 1977. Glyoxylate metabolism and fatty acid oxidation in mango fruit during development and ripening. *Phytochemistry*. 16 (1): 51-54.
3. Chen, T., G. Qin and S. Tian. 2020. Regulatory network of fruit ripening: current understandings and future challenges. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.16822>
4. Chen, Y., J. Grimplet, K. David, S.D. Castellarin, J. Terol, D.C.J. Wong, Z.W. Luo, R. Schaffer, J.M. Celton, M. Talon, G.A. Gambetta and C. Chervin. 2018. Ethylene receptors and related proteins in climacteric and non-climacteric fruits. *Plant Sci*. 276: 63-72.
5. Chervin, C., A. El-Kereamy, J.P. Roustan, A. Latché, J. Lamon and M. Bouzayen. 2004. Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Sci*. 167: 1301-1305.
6. Chin, C.H., S.H. Chen, H.H. Wu, C.W. Ho, M.T. Ko and C.Y. Lin. 2014. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Syst Biol*. 8 (Suppl 4): S11.
7. Goldschmidt, E.E., M. Huberman and R. Goren. 1993. Probing the role of endogenous ethylene in the degreening of citrus fruit with ethylene antagonists. *Plant Growth Regul*. 12: 325-329.
8. Huang, H.X., T. Yu, J.X. Li, S.P. Qu, M.M. Wang, T.Q. Wu and Y.J. Zhong. 2019. Characterization of *Cucurbita maxima* fruit metabolomic profiling and transcriptome to reveal fruit quality and ripening gene expression patterns. *J. Plant Biol*. 62(3): 203-216.

منابع

9. Irizarry, R.A., B. Hobbs, F. Collin, Y.D. Beazer-Barclay, K.J. Antonellis, U. Scherf and T.P. Speed. 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostat.* 4: 249–264.
10. Jia, H., Y. Chai, C.L. Li, D. Lu, J. Luo, L. Qin and Y. Shen. 2011. Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiol.* 157: 188–199.
11. Jia, H., Y. Wang, M. Sun, B. Li, Y. Han, Y. Zhao, X. Li, N. Ding, C. Li, W. Ji and W. Jia. 2013. Sucrose functions as a signal involved in the regulation of strawberry fruit development and ripening. *New Phytologist.* 198: 453–465.
12. Jiao, X., B.T. Sherman, R. Stephens, M.W. Baseler, H.C. Lane and R.A. Lempicki. 2012. DAVID-WS: a stateful web service to facilitate gene/protein list analysis. *Bioinformatics.* 28 (13): 1805-1806.
13. Katz, E., P.M. Lagunes, J. Rivov, D. Weiss and E.E. Goldschmidt. 2004. Molecular and physiological evidence suggests the existence of a system II-like pathway of ethylene production in non-climacteric Citrus fruit. *Planta.* 219: 243–252.
14. Klimek-Szczykutowicz, M., A. Szopa and H. Ekiert. 2020. *Citrus limon* (Lemon) phenomenon-a review of the chemistry, pharmacological properties, applications in the modern pharmaceutical, food, and cosmetics industries, and biotechnological studies. *Plants (Basel).* 9(1): 119.
15. Kou, X., C. Liu, L. Han, S. Wang and Z. Xue. 2016. NAC transcription factors play an important role in ethylene biosynthesis, reception and signaling of tomato fruit ripening. *Mol. Genet. Genomics.* 291: 1205–1217.
16. Lee, Y.P., G.H. Yu, Y.S. Seo, S.E. Han, Y.O. Choi, D. Kim, I.G. Mok, W.T. Kim and S.K. Sung. 2007. Microarray analysis of apple gene expression engaged in early fruit development. *Plant Cell Rep.* 26(7): 917-926.
17. Lin, Q., Q. Jiang, J. Lin, D. Wang, S. Li, C. Liu, C. Sun and K. Chen. 2015. Heat shock transcription factors expression during fruit development and under hot air stress in Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan) Fruit. 559: 129-36
18. Liu, M. and C. Chervin. 2017. Ethylene and Fruit Ripening. In: Reference Module in Food Science. (Reference Module in Food Science). Elsevier. 1-17. ISBN 978-0-08-100596-5
19. Liu, M., J. Pirrello, C. Chervin, J.P. Roustan and M. Bouzayen. 2015. Ethylene control of fruit ripening: revisiting the complex network of transcriptional regulation. *Plant Physiol.* 169: 2380–2390.
20. Ma, G., L. Zhang, W. Yungyuen, Y. Sato, T. Furuya, M. Yahata, K. Yamawaki and M. Kato. 2018. Accumulation of carotenoids in a novel citrus cultivar 'Seinannohikari' during the fruit maturation. *Plant Physiol. Bioch.* 129: 349-356.
21. Ma, Q., G. Zhang, L. Hou, W. Wang and J. Hao. 2015. *Vitis vinifera* VvWRKY13 is an ethylene biosynthesis-related transcription factor. *Plant Cell Rep.* 34: 1593–1603.
22. Moing, A., C. Rothan, L. Svanella, D. Just, P. Diakou, P. Raymond, J.P. Gaudillere and R. Monet. 2000. Role of phosphoenolpyruvate carboxylase in organic acid accumulation during peach fruit development. *Physiol. Plant.* 108: 1-10
23. Pech, J.C., E. Purgatto, M. Bouzayen and A. Latché. 2012. Ethylene and fruit ripening. *Ann. Plant Rev.* 44: 275–304.
24. Pilati, S., M. Perazzolli, A. Malossini, A. Cestaro, L. Demattè, P. Fontana, A. Dal Ri, R. Viola, R. Velasco and C. Moser. 2007. Genome-wide transcriptional analysis of grapevine berry ripening reveals a set of genes similarly modulated during three seasons and the occurrence of an oxidative burst at véraison. *BMC Genomics.* 8: 428.
25. Ritchie, M.E., B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C.W. Law, W. Shi and G.K. Smyth. 2015. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 43:e47.
26. Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N.S. Baliga, J.T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski and T. Ideker. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13: 2498-504.
27. Shin, S.Y., S.H. Kim, H.J. Kim, S.J. Jeon, S.A. Sim, G.R. Ryu, C.M. Yoo, Y.H. Cheong and J.C. Hong. 2016. Isolation of three B-box zinc finger proteins that interact with STF1 and COP1 defines a HY5/COP1 interaction network involved in light control of development in soybean. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478(3): 1080-6.
28. Tang, H., X. Zhang, B. Gong, Y. Yan and Q. Shi. 2020. Proteomics and metabolomics analysis of tomato fruit at different maturity stages and under salt treatment. *Food Chem.* 311: 126009

29. Terol, J., M.J. Nueda, D. Ventimilla, F. Tadeo and M. Talon. 2019. Transcriptomic analysis of *Citrus clementina* mandarin fruits maturation reveals a MADS-box transcription factor that might be involved in the regulation of earliness. *BMC Plant Biol.* 19(1): 47.
30. Vanharanta S. and V. Launonen. 2011. Fumarate Hydratase. In: Schwab M. (eds) *Encyclopedia of Cancer*. Springer, Berlin, Heidelberg.
31. Wang, J.H., J.J. Liu, K.L. Chen, H.W. Li, J. He, B. Guan and L. He. 2017. Comparative transcriptome and proteome profiling of two *Citrus sinensis* cultivars during fruit development and ripening. *BMC Genomics.* 18(1): 984.
32. Wang, Q.H., C. Zhao, M. Zhang, Y.Z. Li, Y.Y. Shen and J.X. Guo. 2017. Transcriptome analysis around the onset of strawberry fruit ripening uncovers an important role of oxidative phosphorylation in ripening. *Sci. Rep.* 7: 41477.
33. Wang, R., G.C. Angenent, G. Seymour and R.A. de Maagd RA. 2020. Revisiting the role of master regulators in tomato ripening. *Trends in Plant Sci.* 25: 291–301.
34. Wang, W., J. Cai, P. Wang, S. Tian and G. Qin. 2017. Post-transcriptional regulation of fruit ripening and disease resistance in tomato by the vacuolar protease SIVPE3. *Genome Biol.* 18: 47.
35. Yu, K., Q. Xu, X. Da, F. Guo, Y. Ding and X. Deng. 2012. Transcriptome changes during fruit development and ripening of sweet orange (*Citrus sinensis*). *BMC Genomics.* 13: 10.
36. Zarembinski, T.I. and A. Theologis. 1994. Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. *Plant Mol. Biol.* 26: 1579–1597.
37. Zhang, M., B. Yuan and P. Leng. 2009. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *J. Exp. Bot.* 60: 1579–1588.
38. Zhao, Y., Y. Huang, Y. Wang, Y. Cui, Z. Liu and J. Hua. 2018. RNA interference of GhPEPC2 enhanced seed oil accumulation and salt tolerance in Upland cotton. *Plant Sci.* 271: 52-61.
39. Zhu, Q., P. Gao, S. Liu, Z. Zhu, S. Amanullah, A.R. Davis and F. Luan. 2017. Comparative transcriptome analysis of two contrasting watermelon genotypes during fruit development and ripening. *BMC Genomics.* 18: 3. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3442>

Identification of Key Genes Involved in Lemon (*Citrus limon*) Ripening using Microarray Data Analysis

Z. Zinati *, H. Amin and S. Sazegari¹

Extensive attempts have been made to clarify the molecular basis of fruit ripening mechanisms in recent decades. Regarding the effect of molecular and genetic processes in regulating fruit ripening, a comprehensive understanding of the ripening genetic network which is involved in fruit quality, ripening time, and shelf life of fruits is necessary. Due to the nutritional and medicinal value of lemon, microarray data of fruit juice vesicle tissue at two developmental stages (immature and mature) was analyzed in the present study. We aimed to identify genes and pathways related to ripening through bioinformatics tools, including the limma package, DAVID, STRING, and iTAK. According to the results, 4,255 probes showed differential expression between the mature and immature stages. Based on the analysis, carotenoid biosynthesis was identified as one of the KEGG-enriched pathways. Considering the upregulated genes in the carotenoid biosynthesis pathway during maturation and its role in abscisic acid (ABA) biosynthesis, it can be stated that ABA signaling might play a vital role in the maturation of lemon fruit. Besides, enhanced expression of ethylene biosynthesis genes during the ripening stage might confirm the role of ethylene and its signal transduction in the ripening of this fruit. Based on the results of this study, the gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1 enzyme showed the highest expression fold change (13.05 times) in the mature compared to immature lemon. A survey for the determination of upregulated transcription factors, resulted in the identification of 41 transcription factors. Also, upregulated genes network analysis led to the identification of 10 genes, such as the HY5-like transcription factor involved in the maturation process. Manipulation of these identified genes is introduced as one of the approaches to improve secondary metabolites, and change ripening time in lemon fruit which can lead to developing cultivars with favorable ripening time that can be grown in various areas.

Keywords: Transcriptome, *Citrus*, Gene network, KEGG pathway analysis, Transcription factor.

1. Assistant Professor of Plant Breeding, Department of Agroecology, Assistant Professor of Horticultural Science, Department of Plant Production, College of Agriculture and Natural Resources of Darab and Former Ph.D. Student of Institute of Biotechnology, Shiraz University, Shiraz, Iran.

* Corresponding Author, Email: (Zahra.zinati@gmail.com).