University of Guilan
Faculty of Agricultural Sciences

Cereal Research
Vol. 14, No. 4, Winter 2025 (347-362)
doi: 10.22124/CR.2025.29246.1844
pISSN: 2252-0163 eISSN: 2538-6115

RESEARCH PAPER OPEN ACCESS

Identification of key genes and miRNAs involved in drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.)

Sahar Shojaee[1], Mohammad Mohsenzadeh Golfazani[2*], Habibollah Samizadeh Lahiji[3] and Maryam Pasandideh Arjmand[4]

1. Ph. D. Candidate, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
2. Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran ([*] Corresponding author: mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir)
3. Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
4. Ph. D. Graduate, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran (New address: Researcher, BioGenTAC Inc., Technology Incubator of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran-North Branch (ABRII), Rasht, Iran)

Comprehensive abstract

Introduction

Plants are often exposed to a various biotic and abiotic stresses. Salinity, drought, and temperature stresses are abiotic factors that negatively affect on physiological and biochemical characteristics of plants and reduce crop growth and productivity. Identifying key characteristics related to biotic and abiotic stresses is important in understanding plant responses at the molecular and cellular levels. Studying miRNA components in crop plants is an effective tool for early detection of stresses, physiological changes, and regulation of gene expression. The objective of this study was to identify key genes and miRNAs involved in drought stress tolerance and introduce them to improve rice plants for drought stress tolerance.

Materials and methods

In this study, microarray data of two drought-tolerant (Dagad Deshi) and drought-sensitive (IR20) rice varieties under drought stress were collected in three replications from the NCBI database and differentially expressed genes in these genotypes were identified using the GEO2R tool. Genes with LogFC ≥ 3 and LogFC ≤ -3 were considered as genes with increased and decreased expression, respectively. To determine the common genes between the sensitive (IR20) and tolerant (Dagad Deshi) genotypes, the VENNY tool was used, and to select key genes responsive to drought stress, genes that were expressed only in the drought-tolerant genotype were identified using the Cytoscape software, with the CytoHubba plugin and the MCC (Maximal Clique Centrality) method. The biological processes of key genes and differentially expressed gene pathways were assessed by the DAVID tool and the most important pathways were identified using the path analysis by the KEGG database. The psRNATarget tool version 2017 was also used to identify miRNAs regulating key genes.

Research findings

Microarray data analysis revealed that under drought stress conditions, significant up-expressed and down-expressed genes were observed in 33% and 26% of genes in the tolerant cultivar (Dagad Deshi) and 7% and 6% of genes in the sensitive cultivar (IR20), respectively. Also, in both tolerant and sensitive cultivars, 766 and 340 genes exhibited significant increase and decrease in gene

expression, respectively. The most significant biological processes, cellular components and molecular functions among the up-expressed genes in the tolerant cultivar (Dagad Deshi), included response to salicylic acid, cytoplasm and carboxylase activity, respectively, and among the down-expressed genes included monomethylation of peptidyl lysine, large mitochondrial ribosomal subunit and long-chain acyl-CoA reductase activity forming alcohol, respectively. KEGG pathway enrichment analysis revealed that the up-expressed and down-expressed genes in the tolerant cultivar were enriched in 18 and 10 pathways, respectively. Among the altered expression genes, 15 genes including several genes from the *MCM* (*Minichromosome Maintenance Complex*) gene family, were selected as key genes involved in the drought stress tolerance pathway in rice. These genes included *MCM5*, *Os05g0358200*, *MCM4*, *MCM7*, *NAC037*, *CDC6, OS11G0128400, RPA2A, OS12G0124700, MCM3, POLA, Os07g0406800, MCM6, Os05g0160800* and *PCNA* genes. Finally, 247 miRNAs including osa-miR172c, osa-miR1849, osa-miR2925, osa-miR397a and osa-miR414 were identified and introduced for genes involved in the drought stress tolerance pathway in rice.

Conclusion

Based on the results of this study, 15 genes including several genes from the *MCMs* gene family as well as 247 miRNAs were identified as key genes and miRNAs involved in the drought stress tolerance pathway in rice. The genes and miRNAs identified in this study can be used to improve and produce drought-tolerant plants in rice.

Keywords: Abiotic stresses, Cytoscape, Gene expression, GEO2R, Microarray

Received: December 14, 2024 Accepted: January 11, 2025

Cite this article:

Shojaee, S., Mohsenzadeh Golfazani, M., Samizadeh lahiji, H., & Pasandideh Arjmand, M. (2024). Identification of key genes and miRNAs involved in drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Cereal Research*, *14*(4), 347-362. doi: 10.22124/CR.2025.29246.1844.

تحقیقات غلات
دوره چهاردهم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۳ (۳۶۲-۳۴۷)
doi: 10.22124/CR.2025.29246.1844
مقاله پژوهشی
دسترسی آزاد

شناسایی ژن‌های کلیدی و miRNA های دخیل در تحمل به تنش خشکی در برنج (*Oryza sativa* L.)

سحر شجاعی[۱]، محمد محسن‌زاده گلفزانی[۲*]، حبیب‌اله سمیع‌زاده لاهیجی[۳] و مریم پسندیده ارجمند[۴]

۱- دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران (* نویسنده مسئول: mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir)
۳- استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۴- دانش‌آموخته دکتری، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران (آدرس جدید: پژوهشگر، واحد فناور زیست رادان ژن کاسپین (بیوژن تک)، مرکز رشد واحدهای فناور، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور، رشت، ایران)

چکیده جامع

مقدمه: گیاهان اغلب در معرض انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار می‌گیرند. تنش‌های شوری، خشکی و دما از عوامل غیرزیستی هستند که با تأثیر منفی بر ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهان، سبب کاهش رشد و بهره‌وری محصول می‌شوند. شناسایی صفات کلیدی مرتبط با تنش‌های زیستی و غیرزیستی برای درک پاسخ گیاهان در سطح مولکولی و سلولی اهمیت زیادی دارد. مطالعه ترکیبات miRNA در گیاهان زراعی ابزار مؤثری برای تشخیص زودهنگام تنش‌ها، تغییرات فیزیولوژیک و تنظیم بیان ژن‌ها است. هدف از انجام این مطالعه، شناسایی ژن‌ها و miRNA های کلیدی درگیر در تحمل به تنش خشکی و معرفی آن‌ها در راستای به‌نژادی گیاه برنج برای تحمل به تنش خشکی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، داده‌های میکروآرایه دو رقم برنج متحمل (Dagad Deshi) و حساس (IR20) تحت تنش خشکی از پایگاه داده NCBI با سه تکرار جمع‌آوری و ژن‌های تفرق‌یافته در این دو ژنوتیپ با استفاده از ابزار GEO2R شناسایی شدند. ژن‌های با $LogFC \geq 3$ و $LogFC \leq -3$ به‌ترتیب به‌عنوان ژن‌های با افزایش و کاهش بیان در نظر گرفته شدند. به‌منظور تعیین ژن‌های مشترک بین ژنوتیپ‌های حساس (IR20) و متحمل (Dagad Deshi) از ابزار VENNY استفاده شد و جهت انتخاب ژن‌های کلیدی پاسخ دهنده به تنش خشکی، ژن‌هایی که فقط در ژنوتیپ متحمل بیان شدند، با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape، پلاگین CytoHubba و روش MCC (Maximal Clique Centrality) شناسایی شدند. فرآیندهای زیستی ژن‌های کلیدی و مسیرهای ژن‌هایی که تفرق بیان یافتند، توسط ابزار DAVID بررسی و مسیرهای مهم‌تر با استفاده از تجزیه مسیر به‌کمک پایگاه داده KEGG شناسایی شدند. برای شناسایی miRNA های تنظیم کننده ژن‌های کلیدی نیز از ابزار psRNATarget نسخه ۲۰۱۷ استفاده شد.

یافته‌های تحقیق: تجزیه و تحلیل داده‌های میکروآرایه نشان داد که در شرایط تنش خشکی در رقم متحمل (Dagad Deshi)، ۳۳ درصد و ۲۶ درصد از ژن‌ها به‌ترتیب افزایش و کاهش بیان معنی‌دار نشان دادند، در حالی‌که در رقم حساس (IR20)، افزایش و کاهش بیان معنی‌دار به‌ترتیب در هفت و شش درصد از ژن‌ها مشاهده شد. همچنین، ۷۶۶ ژن در هر دو رقم متحمل و حساس، افزایش بیان و ۳۴۰ ژن کاهش بیان معنی‌داری را نشان دادند. معنی‌دارترین فرآیندهای زیستی، اجزای سلولی و عملکردهای مولکولی در بین ژن‌های افزایش بیان یافته در رقم متحمل به‌ترتیب شامل پاسخ به سالیسیلیک اسید، سیتوپلاسم و فعالیت کربوکسی لیاز و در بین ژن‌های کاهش بیان یافته به‌ترتیب شامل مونومتیلاسیون پپتیدیل لیزین، زیرواحد بزرگ ریبوزومی میتوکندری و فعالیت آسیل CoA ردوکتاز با زنجیره بلند تشکیل دهنده الکل بودند. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر KEGG نشان داد که ژن‌های افزایش و کاهش بیان یافته در رقم متحمل به‌ترتیب در ۱۸ و ۱۰ مسیر غنی شدند. از بین ژن‌های تغییر بیان یافته، ۱۵ ژن از جمله چندین ژن از خانواده ژنی *MCM* (*Minichromosome Maintenance Complex*) به‌عنوان ژن‌های موثر و کلیدی در مسیر تحمل به تنش خشکی در برنج انتخاب شدند. این ژن‌ها شامل *MCM5*، *Os05g0358200*، *MCM4*، *MCM7*، *NAC037*، *OS11G0128400*، *CDC6*، *RPA2A*، *OS12G0124700*، *MCM3*، *POLA*، *Os07g0406800*، *MCM6*، *Os05g0160800* و *PCNA* بودند. علاوه بر این، برای ژن‌های موثر در مسیر تحمل به تنش خشکی در برنج، تعداد ۲۴۷ miRNA از جمله osa-miR172c، osa-miR1849، osa-miR2925، osa-miR397a و osa-miR414 نیز شناسایی و معرفی شدند.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه، تعداد ۱۵ ژن از جمله چندین ژن از خانواده ژنی *MCMs* و همچنین ۲۴۷ miRNA به‌عنوان ژن‌ها و miRNA های موثر و کلیدی دخیل در مسیر تحمل به تنش خشکی در برنج شناسایی شدند. از ژن‌ها و miRNA های شناسایی شده در این تحقیق می‌توان به‌منظور به‌نژادی و تولید گیاهان متحمل به تنش خشکی در برنج استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، تنش‌های غیرزیستی، سایتواسکیپ، میکروآری، GEO2R

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲۲

نحوه استناد به این مقاله:

شجاعی، سحر، محسن‌زاده گلفزانی، محمد، سمیع‌زاده لاهیجی، حبیب‌اله، و پسندیده ارجمند، مریم. (۱۴۰۳). شناسایی ژن‌های کلیدی و miRNA های دخیل در تحمل به تنش خشکی در برنج (*Oryza sativa* L.). *تحقیقات غلات*، ۱۴(۴)، ۳۶۲-۳۴۷.
doi: 10.22124/CR.2025.29246.1844

مقدمه

کمبود آب شیرین، به‌ویژه در مناطق خشک، به‌دلیل افزایش جمعیت، تغییرات اقلیمی و مدیریت ناکارآمد تشدید شده و مدیریت پایدار آن برای امنیت غذایی و توسعه پایدار ضروری است (Asres, 2023). برنج پس از گندم، مهم‌ترین محصول زراعی و غذایی برای بیش از نیمی از جمعیت جهان به‌شمار می‌آید و دستیابی به امنیت غذایی، وابسته به تولید و دسترسی کافی به آن ضروری است (Ali *et al*., 2020). تنش‌های شوری، خشکی و دما از عوامل غیرزیستی هستند که با تأثیرات منفی بر ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهان، عملکرد محصولات را در مراحل مختلف رشد به‌شدت کاهش می‌دهند (Chandra & Roychoudhury, 2020). پاسخ گیاه به تنش خشکی عموماً با توجه به ویژگی‌های فیزیولوژیک آن از جمله محتوای نسبی آب و پاسخ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی و مطالعه قرار می‌گیرد (Batool *et al*., 2020). علاوه بر این، طی تنش خشکی، با بسته شدن روزنه‌ها، کاهش تثبیت دی اکسید کربن و بروز پدیده بازدارندگی نوری، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولید می‌شوند که منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو و تخریب پروتئین‌ها، لیپیدها و سایر اجزای سلولی می‌شوند (Seleiman *et al*., 2021). ویژگی‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهان به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار می‌گیرند. با این‌حال، این تغییرات در گیاهان مختلف اختصاصی نیست و بسته به گونه گیاه، ممکن است تفاوت‌هایی نشان دهند (Asefpour Vakilian, 2019).

شناسایی صفات کلیدی مرتبط با تنش‌های زیستی و غیرزیستی برای درک پاسخ گیاهان در سطح مولکولی و سلولی اهمیت دارد. مطالعه ترکیبات miRNA در گیاهان زراعی ابزار مؤثری برای تشخیص زودهنگام تنش‌ها، تغییرات فیزیولوژیک و تنظیم ژن‌ها است (Noman & Aqeel, 2017). ترکیبات miRNA، به‌عنوان مولکول‌های کوچک RNA غیرکدکننده در موجودات زنده، اگرچه تنها از ۱۷ تا ۲۳ نوکلئوتید تشکیل شده‌اند، اما اثرات قابل توجهی بر بیان ژن‌ها دارند (Ha & Kim, 2014). اهداف زیستی این ترکیبات در گیاهان عمدتاً شامل پروتئین‌های مرتبط با فرآیندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نظیر رشد، تنظیم هورمون‌ها و انتقال سیگنال‌ها است (Li & Yu, 2021). همچنین، این ترکیبات نقش تعیین‌کننده‌ای در پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی دارند (Gong *et al*., 2020). ترکیبات miRNA مختلفی در گیاه برنج شناسایی شده‌اند که در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی نقش مهمی ایفا می‌کنند. داس و همکاران (Das *et al*., 2021) نشان دادند که ترکیباتی مانند miRNA-156، miRNA-159، miRNA-164، miRNA-169، miRNA-393، miRNA-395، miRNA-402 و miRNA-528 به‌طور قابل توجهی به این تنش‌ها واکنش نشان می‌دهند. بیان ترکیبات miRNA در ارتباط با تنش‌های گیاهی معمولاً به‌طور اختصاصی عمل می‌کند و این اختصاصیت به اندام گیاه و سطح پیشرفت تنش بستگی دارد (Li *et al*., 2022). شناسایی ترکیبات miRNA مرتبط با پاسخ گیاه به تنش، به درک بهتر نقش آن‌ها در بهبود مکانیزم‌های تحمل به تنش در گیاه کمک می‌کند (Zhang *et al*., 2022a; Pasandideh Arjmand *et al*., 2024). نقش ساختارهای ژن هدف و ترکیبات miRNA در تنظیم پاسخ گیاهان به تنش، به‌طور گسترده‌ای در دهه گذشته مورد بررسی قرار گرفته است (Gao *et al*., 2022). خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که بر عملکرد برنج موثر است. شناسایی مکانیزم‌ها و مسیرهای زیستی مرتبط با پاسخ گیاه به این تنش از اولویت‌های پژوهشی است. هدف از این مطالعه، شناسایی ژن‌ها و miRNAهای کلیدی و مسیرهای عملکردی دخیل در تحمل به تنش خشکی با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک بود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این مطالعه، داده‌های میکروآری دو رقم متحمل (Dagad Deshi) و حساس (IR20) برنج (GSE41647) که به‌مدت هفت روز در دمای ۱±۲۸ درجه سلسیوس در شرایط هیدروپونیک در محیط یوشیدا کشت شدند و در مرحله جوانه‌زنی (هفت روزگی) به‌مدت شش ساعت توسط پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG 6000) تحت شرایط تنش خشکی قرار گرفتند، از پایگاه NCBI GEO (Gene Expression Omnibus) با سه تکرار جمع‌آوری شد. داده‌های خام ابتدا نرمال و سپس با استفاده از ابزار GEO2R (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) تحلیل شدند. ژن‌های مورد نظر به‌طور جداگانه در سطح احتمال پنج درصد ($P \leq 0.05$) انتخاب شدند. با هدف معرفی ژن‌هایی که تفاوت بیان بیش‌تری در شرایط تنش داشتند، ژن‌های با لگاریتم تغییر بیان (Log of Fold

Change) سه برابر و بیش‌تر (LogFC ≥ 3) به‌عنوان ژن‌های با افزایش بیان و ژن‌های با تغییر بیان منفی سه برابر و کم‌تر (LogFC ≤ -3) به‌عنوان ژن‌های با کاهش بیان در نظر گرفته شدند (Pasandideh Arjmand *et al.*, 2024). سپس ژن‌های مشترک بین ژنوتیپ‌های حساس و متحمل با استفاده از ابزار VENNY (https://jvenn.toulouse.inrae.fr/app/example.html) مشخص و در ادامه، با هدف شناسایی ژن‌های کلیدی پاسخ دهنده به تنش خشکی، ژن‌هایی که فقط در ژنوتیپ متحمل (Dagad Deshi) بیان شدند، به‌کمک نرم‌افزار Cytoscape ver. 3.9.1، پلاگین CytoHubba و روش MCC (Maximal Clique Centrality) شناسایی شدند. MCC یک روش تحلیل توپولوژیک است که به شناسایی ژن‌های کلیدی و زیرشبکه‌ها کمک می‌کند. این روش بر اساس نظریه گراف عمل می‌کند و بر شناسایی نواحی با اتصال بالا تمرکز دارد که اغلب با ماژول‌های عملکردی مهم مانند کمپلکس‌های پروتئینی یا مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط هستند (Li *et al.*, 2020). فرآیندهای زیستی ژن‌های کلیدی و مسیرهای ژن‌های تفرق بیان یافته توسط ابزار DAVID (v2023q4) (https://david.ncifcrf.gov) بررسی شد. به‌منظور شناسایی مسیرهای مهم نیز از تجزیه مسیر به‌کمک پایگاه داده KEGG (Genomes and Genes of Encyclopedia Kyoto) استفاده شد. همچنین پیش‌بینی (Expectation) پنج برای شناسایی miRNA های تنظیم کننده ژن‌های کلیدی توسط ابزار psRNATarget نسخه ۲۰۱۷ (https://www.zhaolab.org/psRNATarget) در نظر گرفته شد تا تمامی miRNA ها شناسایی شوند. برهمکنش miRNA ها نیز با استفاده از ابزار Cytoscape رسم شد (Pasandideh Arjmand *et al.*, 2024).

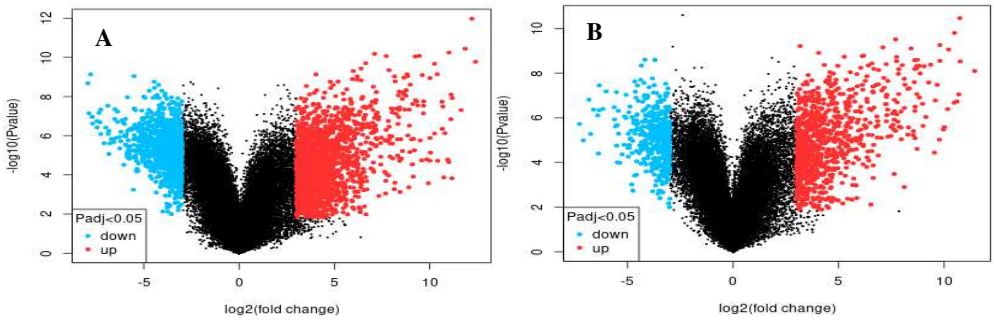
نتایج و بحث

نمودار آتشفشانی (Volcano Plot) بیان ژن‌ها تحت شرایط تنش خشکی در دو رقم متحمل (Dagad Deshi) و حساس (IR20) در شکل (۱) ارائه شده است. محور افقی این شکل، تغییرات نسبی (Fold Change) بیان ژن‌ها را در مقیاس لگاریتم پایه دو (Log_2FC) و محور عمودی آن نیز سطح احتمال معنی‌دار بیان ژن‌ها را در مقیاس معکوس لگاریتم پایه ۱۰ ($-Log_{10}P\text{-value}$) نشان می‌دهد. نقاط سمت راست و چپ نمودار به‌ترتیب افزایش و کاهش بیان و نقاط بالاتر روی محور معنی‌داری بیش‌تر را نشان می‌دهند. تحلیل داده‌های میکرواری نشان داد که در شرایط تنش خشکی در رقم متحمل (Dagad Deshi) و حساس (IR20) به‌ترتیب ۲۷۴۸ و ۱۲۸۰ ژن تغییر بیان داشتند (شکل ۱). بررسی نمودار ون (Venn diagram) نشان داد که در رقم متحمل، ۳۳ درصد (۹۱۵/۲۷۴۸) و ۲۶ درصد (۷۲۷/۲۷۴۸) از ژن‌ها به‌ترتیب افزایش و کاهش بیان معنی‌دار داشتند، در حالی‌که در رقم حساس، هفت (۹۲/۱۲۸۰) و شش (۸۲/۱۲۸۰) درصد از ژن‌ها به‌ترتیب افزایش و کاهش بیان معنی‌داری را نشان دادند (شکل ۲). همچنین، ۷۶۶ ژن در هر دو رقم متحمل و حساس افزایش و ۳۴۰ ژن کاهش بیان معنی‌داری داشتند. با توجه به اهمیت ژن‌هایی که فقط در رقم متحمل تغییر بیان داشتند، از این‌رو این ژن‌ها بررسی و از بین آن‌ها، ژن‌های کلیدی دخیل در تحمل این رقم نسبت به تنش خشکی و مسیرهای درگیر، شناسایی شدند.

هستی‌شناسی ژن‌ها

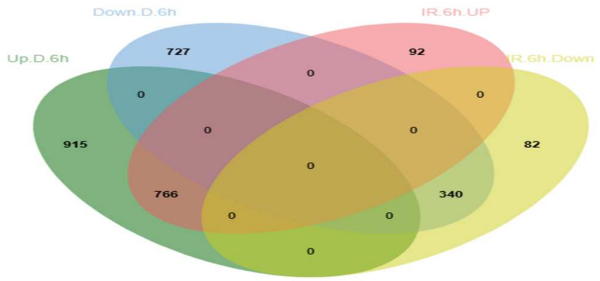
طبقه‌بندی ژن‌های تغییر بیان یافته (شامل افزایش و کاهش بیان) در دو رقم متحمل و حساس به تنش خشکی به‌صورت جداگانه انجام شد (شکل‌های ۳ و ۴). این طبقه‌بندی، روشی مرسوم جهت تفسیر داده‌های ترنسکریپتوم، به‌عنوان نخستین گام در تحلیل ژنومیک عملکردی است. هستی‌شناسی ژن‌های تغییر بیان‌یافته در سه دسته اصلی شامل فرایندهای زیستی، اجزای سلولی و عملکرد مولکولی بررسی و مشخص شد که معنی‌دارترین فرآیندهای زیستی، اجزای سلولی و عملکردهای مولکولی در بین ژن‌های افزایش بیان یافته در رقم متحمل (Dagad Deshi) به‌ترتیب شامل پاسخ به سالیسیلیک اسید (GO:0009751)، سیتوپلاسم (GO:0005737) و فعالیت کربوکسی لیاز (GO:0016831) و در بین ژن‌های کاهش بیان یافته شامل مونومتیلاسیون پپتیدیل لیزین (GO:0018026)، زیر واحد بزرگ ریبوزومی میتوکندری (GO:0005762) و فعالیت آنزیم اسیل- کوآ ردوکتاز (acyl-CoA reductase) با زنجیره بلند تشکیل دهنده الکل (GO:0102965) بود. سایر فرآیندهای زیستی برای ژن‌های افزایش بیان یافته در رقم متحمل شامل مسیر سیگنال‌دهی گیرنده جفت شده با پروتئین G فعال کننده پروتئین کیناز C (GO:0007205)، سمزدایی یون مس (GO:0010273)، پاسخ به پراکسید هیدروژن

(GO:0042542)، تنظیم رونویسی الگوی DNA (GO:0006355) و پاسخ به تنش اکسیداتیو (GO:0006979) نیز از اهمیت بالایی برخوردار بودند. همچنین، اجزای سلولی ژن‌های افزایش بیان یافته، علاوه بر سیتوپلاسم، شامل گلی‌اکسیزوم (GO:0009514)، فضای خارج سلولی (GO:0005615)، تنفسی (GO:0070469)، سیتوسول (GO:0005829) و منطقه خارج سلولی (GO:0005576) و در نهایت مهم‌ترین عملکردهای مولکولی این ژن‌ها شامل فعالیت کربوکسی لیاز (GO:0016831)، فعالیت کربوکسی پپتیداز (GO:0004180)، فعالیت دی‌اسیل گلیسرول کیناز وابسته به ATP (GO:0004143)، فعالیت ساکارز آلفا گلوکوزیداز (GO:0004575) و فعالیت اندو آلفا- ان-استیل گالاکتوز آمینیداز (GO:0033926) بود. فرآیندهای زیستی ژن‌های کاهش بیان یافته نیز شامل فرآیند متابولیک چربی اسیل- کوآ با زنجیره بلند (GO:0035336)، پاسخ به شدت نور بالا (GO:0009644)، پاسخ به سیتوکنین (GO:0009735)، انتقال فاز چرخه سلولی میتوزی (GO:0044772) و فرآیند بیوسنتزی سلولزی دیواره سلولی (GO:0052324) و اجزای سلولی ژن‌های کاهش بیان یافته شامل سیتوسول (GO:0005829)، اجزای بیرونی غشا (GO:0019898)، میکروتوبول سیتوپلاسمی (GO:0005881)، لومن تیلاکوئید کلروپلاست (GO:0009543) و میکروتوبول هسته‌ای (GO:0005880) بود. در نهایت عملکرد مولکولی این ژن‌ها شامل فعالیت اسیل-کوآ ردوکتاز چرب با زنجیره بسیار بلند تشکیل دهنده الکل (GO:0080019)، فعالیت فعال کننده پروتئین کیناز (GO:0030295)، فعالیت پکتین استیل استراز (GO:0052793)، فعالیت کربوکسی پپتیداز سرین (GO:0004185) و فعالیت پروتئین لیزین ان-متیل ترانسفراز (GO:0016279) بود. در رقم حساس (IR20) نیز معنی‌دارترین فرآیندهای زیستی، اجزای سلولی و عملکردهای مولکولی در بین ژن‌های افزایش بیان یافته به‌ترتیب شامل پاسخ به آبسیزیک اسید (GO:0009737)، کلروپلاست (GO:0009507) و اتصالات کاتیونی (GO:0043169) بود.



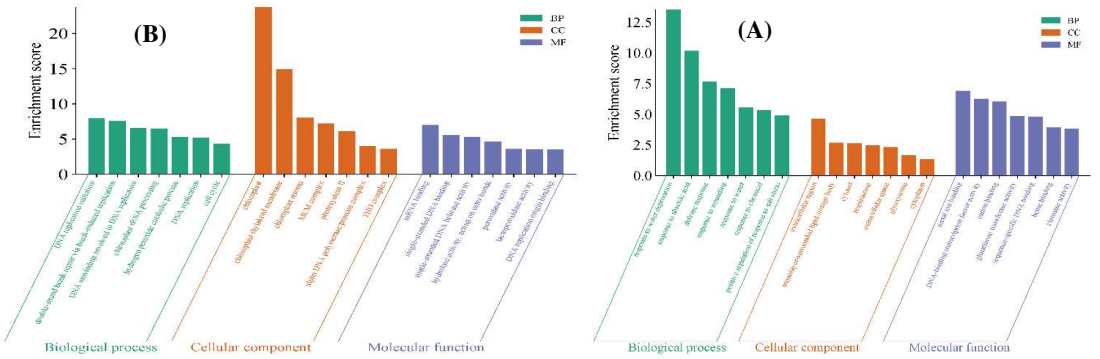
شکل ۱- نمودار آتشفشانی بیان ژن‌ها (|Log Fold Change≤3|) در شرایط تنش خشکی: A) رقم متحمل (Dagad Deshi)، B) رقم حساس (IR20). محورهای افقی و عمودی به‌ترتیب بیان ژن‌ها بر پایه Log_2 و سطح معنی‌دار بر پایه معکوس Log_{10} را نشان می‌دهند.

Figure 1. Volcano plot of genes expression (|Log Fold Change≤3|) under drought stress conditions: A) Tolerant variety (Dagad Deshi), B) Sensitive variety (IR20). The horizontal and vertical axes represent gene expression based on Log_2 and the significant level based on inverse Log_{10}, respectively.



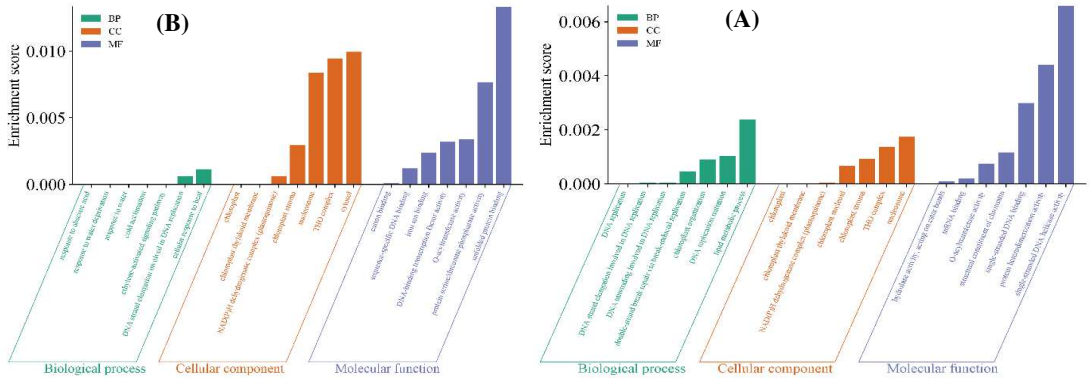
شکل ۲- ژن‌های افزایش و کاهش بیان یافته در رقم‌های متحمل (Dagad Deshi) و حساس (IR20) پس از شش ساعت تنش خشکی

Figure 2. Up- and down-expressed genes in the tolerant (Dagad Deshi) and sensitive (IR20) varieties after six hours drought stress



شکل ۳- مهم‌ترین مسیرهای زیستی، اجزای سلولی و عملکردهای مولکولی ژن‌های افزایش (A) و کاهش (B) بیان‌یافته در رقم متحمل (Dagad Deshi) تحت شرایط تنش خشکی

Figure 3. Most important biological pathways, cellular components and molecular functions of the up-expressed (A) and down-expressed (B) genes in the tolerant variety (Dagad Deshi) under drought stress conditions



شکل ۴- مهم‌ترین مسیرهای زیستی، اجزای سلولی و عملکردهای مولکولی ژن‌های افزایش (A) و کاهش (B) بیان‌یافته در رقم حساس (IR20) تحت شرایط تنش خشکی

Figure 4. Most important biological pathways, cellular components and molecular functions of the up-expressed (A) and down-expressed (B) genes in the sensitive variety (IR20) under drought stress conditions

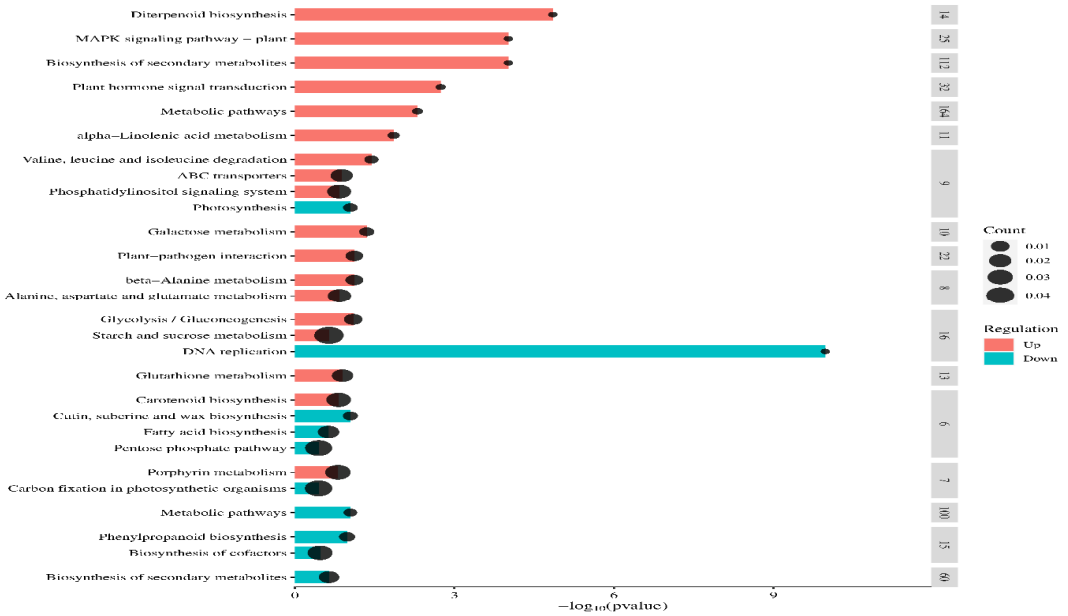
تنش خشکی، علاوه بر کاهش رشد و عملکرد گیاه، فرآیندهای فیزیولوژیک گیاه را مختل می‌کند و باعث افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. این امر موجب تنش اکسیداتیو و اثرات منفی بر سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی، فتوسنتز و ماکرومولکول‌های زیستی می‌شود (El-Esawi & Alayafi, 2019). گیاهان از طریق سازوکارهای مختلف مانند بستن روزنه‌ها، ضخیم شدن لایه کوتیکول، حفظ میزان فتوسنتز و افزایش وزن و طول ریشه، در برابر تنش خشکی و اثرات منفی آن مقاومت می‌کنند (Zhang *et al.*, 2017). مطالعات نشان داده‌اند که تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، ممکن است واکنش گیاه به عوامل تنش‌زا را از طریق فعال یا غیرفعال کردن عوامل رونویسی در مرحله نهایی انتقال سیگنال سلولی تنظیم کنند (Kohli *et al.*, 2018). مسیر سیگنال‌دهی گیرنده جفت‌شده با پروتئین G که پروتئین کیناز C را فعال می‌کند، یکی از مسیرهای مهم در فرآیندهای زیستی است. پروتئین کینازها از تنظیم‌کننده‌های کلیدی در فرآیندهای سلولی به‌شمار می‌آیند و در تحمل گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش اساسی دارند (Kamrava *et al.*, 2024). ژن‌های مربوط به این مسیر در رقم متحمل (Dagad Deshi) افزایش بیان معنی‌داری را نشان دادند. کینازها یا فسفوترانسفرازها آنزیم‌هایی هستند که گروه فسفات پرانرژی را از مولکول‌هایی نظیر آدنوزین تری فسفات (ATP) به سوبستراهای خود منتقل می‌کنند. سوبستراهای کینازها می‌توانند شامل پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها یا چربی‌ها باشند (Yousfi *et al.*, 2016). این آنزیم‌ها در فرآیندهای ارتباط سلولی و القای پیام‌های

رشد و تکثیر نقش اساسی ایفا می‌کنند. پروتئین کینازها به‌عنوان تنظیم کننده‌های کلیدی در فرآیندهای سلولی شناخته می‌شوند و نقش مهمی در تحمل گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارند (Kamrava *et al*., 2024). سالیسیلیک اسید با تنظیم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و مدیریت گونه‌های فعال اکسیژن، نقش کلیدی در مقابله با تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارد. این ترکیب همچنین از طریق کنترل باز و بسته شدن روزنه‌ها و افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌ها مؤثر است و به‌عنوان یک تنظیم کننده رشد برای تقویت تحمل گیاهان مورد توجه قرار گرفته است (Khorrami Moghadam *et al*., 2023). در این پژوهش نیز دیده شد مسیر سالیسیک اسید در ایجاد تحمل در ژنوتیپ مقاوم موثر است. یکی از علل حساسیت رقم حساس، درگیر شدن مسیر پاسخ به ABA بود. ABA اغلب باعث کاهش رشد ریشه و اندام هوایی می‌شود که ممکن است حساسیت به خشکی را افزایش دهد (Ma *et al*., 2024). در بررسی‌های انجام شده در این پژوهش نیز یکی از علل حساسیت رقم حساس، درگیر شدن مسیر پاسخ به ABA بود. کربوکسی لیازها (Carboxy-lyases) آنزیم‌هایی از کلاس لیازها هستند که گروه کربوکسیل ($-CO_2$) را بدون نیاز به آب یا ATP از ترکیبات مختلف حذف می‌کنند. این آنزیم‌ها با تنظیم مسیرهای متابولیکی نقش مهمی در شرایط تنش خشکی ایفا می‌کنند. فسفو انول پیروات کربوکسی لیاز (*PEPC*) در متابولیسم کربن و تنفس نوری، به مدیریت انرژی و ذخیره‌سازی کربوهیدرات‌ها در گیاهان کمک می‌کند. شجاعی و همکاران (Shojaee *et al*., 2022) نشان دادند که بیان ژن *PEPC* در ارقام گندم حساس و متحمل متفاوت بود و این رفتار با روش qPCR نیز تأیید شد. انواع مختلفی از آنزیم آلفا گلوکوزیداز در گیاهان و سایر موجودات وجود دارند که سوبسترای اختصاصی آن‌ها بسیار متنوع است. بسیاری از آن‌ها علاوه بر توانایی هیدرولیز آلفا گلوکوزیدها و الیگوساکاریدها، توانایی هیدرولیز گلیکوژن و آلفا گلوکان را نیز دارند (Poursharifi & Zarei, 2016). در مطالعه حاضر نیز فعالیت این آنزیم در رقم متحمل در شرایط تنش خشکی افزایش یافت و از دلایل تحمل این رقم بود. در رقم متحمل (Dagad Deshi)، ۷۳ عامل رونویسی در این پژوهش شناسایی شد که تغییر بیان معنی‌داری را نشان دادند. ۵۵ عامل رونویسی از جمله *WRKY*، *NAC*، *MYB*، *ethylene-responsive transcription factor* و *MADS-box* افزایش بیان و ۱۸ عامل رونویسی از جمله *E2FA*، *bHLH68*، *PCL1*، *LHW* و *PCF* کاهش بیان معنی‌داری را نشان دادند. عوامل رونویسی پروتئین‌هایی هستند که با اتصال به عناصر تنظیمی در ناحیه بالادست ژن‌های هدف، نقش مهمی در تنظیم بیان این ژن‌ها ایفا می‌کنند. در میان عوامل رونویسی مهم که نقش آن‌ها در تحمل گیاهان به تنش‌های غیرزیستی در مطالعات مختلف شناسایی شده است، سه خانواده *NAC*، *CBF* و *MYB* برجسته هستند (Huang *et al*., 2015). ژن *NAC* در این مطالعه افزایش بیان معنی‌داری را از خود نشان داد و در بین ژن‌های کلیدی معرفی شده در این پژوهش نیز بود. نقش *NAC* ها در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی اثبات شده است و علاوه بر این، وظایف مهمی در توسعه گیاه ایفا می‌کنند. در مطالعه‌ای که روی آرابیدوپسیس تحت تنش خشکی انجام شد، مشخص شد که بیان بیش از حد ژن *RcNAC72* در این گیاه، تحمل به خشکی را افزایش می‌دهد و این ژن در مسیرهای سیگنال‌دهی ABA و DREB/CBF-COR نقش دارد (Jia *et al*., 2022). یکی دیگر از عامل‌های رونویسی که در این مطالعه افزایش بیان داشت، فاکتور *MYB* بود. پروتئین‌های *MYB* نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند. در گیاه آرابیدوپسیس، ۱۵ ژن *MYB* گزارش شده است که با پاسخ به تنش‌ها در ارتباط هستند (Mahmoudi *et al*., 2018). عظیمی و همکاران (Azimi *et al*., 2024) روند بیان متفاوتی را برای فاکتور رونویسی *MYB80* در رقم‌های حساس و متحمل به خشکی گندم مشاهده و عملکرد این ژن را در ایجاد تحمل به تنش خشکی تایید کردند. در بین عامل‌های رونویسی شناسایی شده، ژن‌های *WRKY* افزایش بیان معنی‌داری را نشان دادند. *WRKY* یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های تنظیم کننده رونویسی در گیاهان است و به‌عنوان فعال کننده و مهار کننده در فرآیندهای مهم گیاهی شرکت می‌کند. عامل‌های رونویسی *WRKY* به‌عنوان تنظیم کننده‌های ژنی با فعالیت‌های مثبت و منفی شناخته می‌شوند (Shojaee *et al*., 2020).

غنی‌سازی مسیر KEGG

تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر KEGG نشان داد که ژن‌های افزایش و کاهش بیان یافته در رقم متحمل

به‌ترتیب در ۱۸ و ۱۰ مسیر غنی شدند (شکل ۵). نتایج آنالیز مسیرهای درگیر در این مطالعه نشان داد که ژن‌های افزایش بیان یافته در متابولیسم نشاسته و ساکارز، متابولیسم پورفیرین، بیوسنتز کاروتنوئید، سیستم سیگنال‌دهی فسفاتیدیل اینوزیتول، متابولیسم آلانین، آسپارتات و گلوتامات، انتقال دهنده‌های ABC، متابولیسم گلوتاتیون، گلیکولیز/گلوکونئوژنز، متابولیسم بتا آلانین، تعامل گیاه و پاتوژن، متابولیسم گالاکتوز، تجزیه والین، لوسین و ایزولوسین، متابولیسم آلفا لینولنیک اسید، مسیرهای متابولیک، انتقال سیگنال هورمون گیاهی، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، مسیر سیگنال‌دهی MAPK، بیوسنتز دی‌ترپنوئید نقش دارند. ژن‌های کاهش بیان یافته نیز در تثبیت کربن در موجودات فتوسنتزی، مسیر پنتوز فسفات، بیوسنتز کوفاکتورها، بیوسنتز اسیدهای چرب، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، بیوسنتز فنیل پروپانوئید، بیوسنتز کوتین، سابرین و موم، فتوسنتز، مسیرهای متابولیک و همانندسازی DNA نقش دارند.

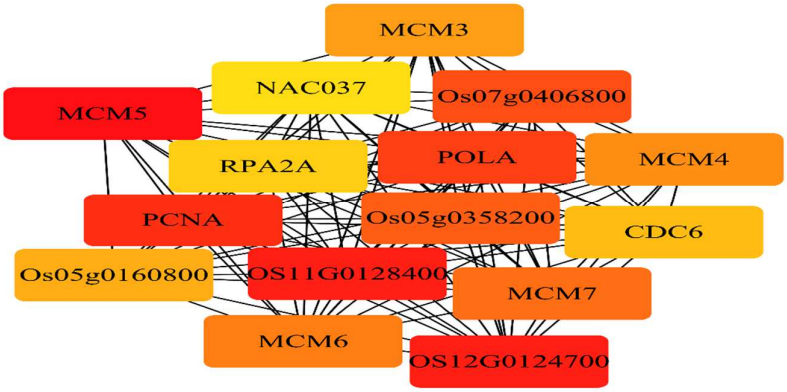


شکل ۵- مسیر KEGG ژن‌های افزایش و کاهش بیان یافته در رقم متحمل به تنش خشکی (Dagad Deshi)

Figure 5. KEGG pathway of up- and down-expressed genes in drought-tolerant variety (Dagad Deshi)

ژن‌های کلیدی شناسایی شده

در این پژوهش، ۱۵ ژن به‌عنوان ژن‌های کلیدی شناسایی شدند که شامل *MCM5* (*Minichromosome Maintenance Complex Component 5*)، *Os05g0358200* (*Minichromosome Maintenance Complex Component 4*)، *MCM4* (*Minichromosome Maintenance Complex Component 7*)، *NAC037* (*NAC Domain-Containing Protein 37*)، *OS11G0128400* (*Cell Division Cycle 6*)، *CDC6* (*Replication Protein A 32 kDa Subunit A*)، *RPA2A* (*Minichromosome Maintenance Complex Component 3*)، *OS12G0124700* (*DNA Polymerase Alpha 1, Catalytic Subunit*)، *POLA* (*Minichromosome Maintenance Complex Component 6*)، *Os07g0406800* (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*)، *MCM6* و *PCNA* (*Os05g0160800*) بودند (شکل ۶). همان‌طور که ملاحظه می‌شود، در بین ژن‌های موثر و کلیدی شناسایی شده در مسیر تحمل به تنش خشکی، چند ژن از خانواده *MCMs* نیز حضور دارند. بررسی میزان تغییرات بیان این ژن‌ها بر مبنای LogFC نشان داد که ژن‌های *MCM5*، *MCM4*، *MCM7*، *MCM3* و *MCM6* به‌ترتیب به‌میزان ۳/۷۶، ۴/۰۵، ۳/۳۳، ۳/۸۴ و ۳/۰۲ برابر در مقیاس LogFC کاهش بیان معنی‌داری تحت شرایط تنش خشکی داشتند.



شکل ۶- ژن‌های کلیدی شناسایی شده در رقم متحمل (Dagad Deshi) تحت شرایط تنش خشکی
Figure 6. Key genes identified in tolerant variety (Dagad Deshi) under drought stress conditions

پروتئین‌های نگهدارنده مینی‌کروموزوم (*MCMs*) ابتدا در جهش‌یافته‌های ساکارومایسس سرویزیه شناسایی و مشخص شد که پروتئین‌های *MCM* از اجزای کلیدی در همانندسازی DNA هستند. در یوکاریوت‌ها، شش عدد از پروتئین‌های *MCM* بسیار حفاظت‌شده هستند و یک هتروهگزامر، کمپلکس MCM 2-7 را تشکیل می‌دهند (Gill *et al*., 2021). قرارگیری کمپلکس *MCM* در محل‌های مبدأ باید به‌شدت تنظیم شود تا اطمینان حاصل شود که بخش DNA هرگز در فاز S دو بار تکرار نمی‌شود. پروتئین‌های *MCM* در تعدادی از گونه‌های گیاهی نیز مشاهده شده‌اند و علاوه بر اهمیت آن‌ها در بازکردن DNA، نقش مهمی در تحمل تنش نیز دارند (Tuteja *et al*., 2011). پروتئین‌های *MCM* در شروع همانندسازی DNA (انتقال از فاز G1 به S) شرکت می‌کنند. این فاز به تشکیل کمپلکس پیش‌همانندسازی نیاز دارد که با اتصال پروتئین چرخه تقسیم سلولی (CDCP; Cell Division Cycle Protein) به مبدأ کمپلکس‌های همانندسازی (ORC; Origin of Replication Complexes) طی فاز G1 آغاز می‌شود و امکان به‌کارگیری کمپلکس پروتئینی *MCM* را فراهم می‌کند (Silva Filho *et al*., 2024). تمام ژن‌های ORC در آرابیدوپسیس و برنج شناسایی شده‌اند.

در بین ژن‌های کلیدی شناسایی شده در این مطالعه، ژن *CDC6* نیز شناسایی شد که به‌میزان ۴/۱۱ برابر کاهش بیان نشان داد. گیل و همکاران (Gill *et al*., 2021)، مکان هسته‌ای کمپلکس MCM را در گیاهان در چرخه سلولی تعیین کردند که طی میتوز در محفظه سیتوپلاسمی آزاد می‌شوند. آرابیدوپسیس حاوی دو ژن *CDC6* و *CDT1* است، در حالی‌که برنج دارای یک ژن *CDC6* و دو ژن *CDT1* است (Gill *et al*., 2021). در بررسی‌های انجام شده در این پژوهش ژن *NAC037* به‌میزان سه برابر افزایش بیان معنی‌دار نشان داد. بررسی ژن‌های القاپذیر توسط تنش در گیاهان نشان داده است که این ژن‌ها به دو دسته تقسیم می‌شوند: دسته اول، همانند چاپرون، پروتئین‌های ضد انجماد و آنزیم‌های سم‌زدا، شامل پروتئین‌هایی هستند که در تحمل به تنش‌های غیرزیستی فعالیت دارند و دسته دوم، مانند عوامل رونویسی و فسفاتازها، شامل پروتئین‌هایی هستند که در تنظیم بیان ژن‌ها فعالیت دارند. ژن‌های *NAC* جزء مسیرهای وابسته به ABA هستند. زمانی که گیاه تحت تنش قرار می‌گیرد، ABA به‌سرعت در ریشه گیاه سنتز و به سلول‌های نگهبان روزنه منتقل می‌شود و در آنجا تجمع می‌یابد و سبب غیرفعال شدن پمپ پتاسیم و در نتیجه مانع ورود پتاسیم به سلول‌های روزنه می‌شود و در نهایت روزنه‌ها بسته می‌شوند (Delarampoor *et al*., 2019).

یکی دیگر از ژن‌های کلیدی شناسایی شده در این پژوهش، ژن *RPA2A* بود که بیان آن به‌میزان ۴/۶۸ برابر کاهش داشت. ژن *RPA2A* یک زیرواحد از پروتئین همانندساز هتروتریمری حفاظت شده A (RPA; Replication Protein A) در آرابیدوپسیس است که یک جزء رپلیزوم (Replisome) است که در طول همانندسازی DNA، به DNA تک رشته‌ای متصل می‌شود. RPA2A مجموعه‌ای از فرآیندهای توسعه‌ای را کنترل می‌کند، اما مکانیسم اساسی آن تا حد زیادی

ناشناخته است. کمپلکس همانندسازی پروتئین A (RPA) به DNA تک‌رشته‌ای تازه باز شده متصل می‌شود و حرکت رپلیزوم را در طول همانندسازی DNA تسهیل می‌کند (Zhang *et al*., 2022b).

یکی دیگر از ژن‌های کلیدی شناسایی شده ژن *PCNA* (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) بود که به‌میزان ۳/۲۷- برابر بیان شد. ژن *PCNA* در برنج، همانند سایر موجودات زنده، به‌عنوان یک عامل مهم در تکثیر و ترمیم DNA عمل می‌کند. این ژن بخشی از کمپلکس DNA پلیمراز دلتا (δ) است و در فرآیندهای زیستی مانند تکثیر سلولی، پاسخ به آسیب‌های DNA و تنظیم چرخه سلولی نقش دارد. بر اساس مطالعه ژانگ و همکاران (Zhang *et al*., 2022c)، مشخص شد که *OsPCNA* در برنج با یک عامل بازسازی کروماتین به‌نام CHR721 تعامل دارد. افزایش بیان ژن *OsPCNA* در شرایط آسیب DNA مشاهده شده است که نشان دهنده دخالت این ژن در مکانیزم پاسخ به آسیب‌های ژنتیکی است (Zhang *et al*., 2022c).

شناسایی miRNA های ژن‌های کلیدی

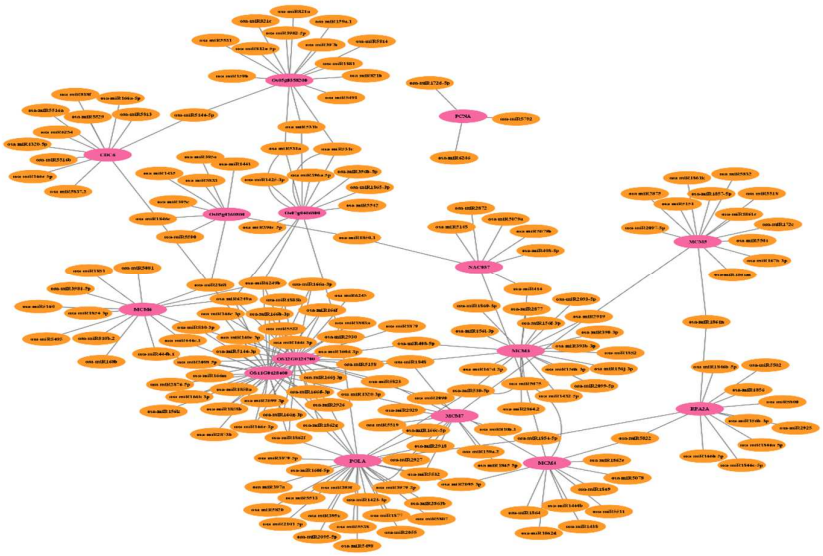
در این مطالعه، miRNA های مرتبط با هر یک از ژن‌های کلیدی معرفی شده نیز شناسایی شد. برای ژن‌های کلیدی *MCM5*، *Os05g0358200*، *MCM4*، *MCM7*، *NAC037*، *OS11G0128400*، *CDC6*، *RPA2A*، *OS12G0124700*، *MCM3*، *POLA*، *Os07g0406800*، *MCM6*، *Os05g0160800* و *PCNA* به‌ترتیب ۱۴، ۱۶، ۱۳، ۱۴، ۸، ۳۴، ۱۲، ۱۲، ۳۴، ۲۱، ۳۰، ۱۴، ۱۴، ۲۵ و سه miRNA شناسایی شد (شکل ۷).

یکی از miRNA های تاثیرگذار روی ژن *MCM5*، osa-miR172c بود. خانواده miR172 از جمله osa-miR172c نقش مهمی در افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش‌های غیرزیستی ایفا می‌کنند. مشخص شده است که بیان osa-miR172c در پاسخ به تنش خشکی افزایش می‌یابد. این miRNA از طریق تنظیم عامل‌های رونویسی مانند پروتئین‌های مشابه (APETALA2) در مدیریت پاسخ گیاه به تنش کمبود آب نقش دارد و مکانیزم‌هایی را برای صرفه‌جویی در مصرف آب فعال می‌کند (Zhang & Chen, 2021).

برخی از مطالعات پیشنهاد می‌کنند که miRNAها از جمله osa-miR1849 می‌توانند با هدف قرار دادن شبکه‌های ژنی ویژه بر ایمنی ذاتی و تحمل برنج نسبت به تنش‌ها تأثیرگذار باشند. به‌عنوان مثال، این miRNA ها ممکن است مکانیزم‌های دفاعی برنج را در برابر عفونت‌های ویروسی تعدیل کنند یا موجب بهبود تحمل برنج نسبت به تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی و شوری شوند (Baldrich & San Segundo, 2016). در این پژوهش osa-miR1849 در ارتباط با ژن *MCM4* شناسایی شد.

در مطالعه‌ایی بیان شد که osa-miR2925 تحت تأثیر تنش شوری افزایش می‌یابد. این miRNA در تنظیم ژن‌های مرتبط با پاسخ به تنش، به‌ویژه ژن‌هایی که در مقاومت یا تحمل به تنش‌ها دخیل هستند (مانند کدهای پروتئین‌های متصل به کلسیم و فاکتورهای رونویسی پاسخ به گرما)، نقش دارد. همچنین، osa-miR2925 در شبکه‌های تنظیمی پیچیده‌ای با RNAهای دایره‌ای تعامل دارد که ژن‌های هدف خود را در پاسخ به تنش‌های محیطی تعدیل می‌کند (Yin *et al*., 2022).

یکی از miRNA های تاثیرگذار روی ژن *POLA*، osa-miR397a می‌باشد. osa-miR397a نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای رشدی گیاه و پاسخ به تنش‌ها دارد. این miRNA در تنظیم بیان ژن‌های لاکاز (Laccase) دخالت دارد که در فرآیندهایی مانند بیوسنتز لیگنین و تشکیل دیواره سلولی نقش کلیدی دارند. osa-miR397a با هدف قرار دادن ژن‌های لاکاز، به تنظیم پاسخ‌های گیاه در برابر تنش‌های مختلف از جمله حملات پاتوژن‌ها و همچنین تنش‌های غیرزیستی کمک می‌کند. در صورتی که osa-miR397a بیش از اندازه بیان شود، می‌تواند بر توسعه بذر تأثیر بگذارد، زیرا از طریق تأثیر بر تولید لیگنین و در نتیجه کشش سلولی، موجب افزایش اندازه و تعداد بذرها می‌شود. یکی از نکات قابل توجه در مورد osa-miR397a این است که تأثیر miR397a ممکن است بسته به زیرگونه‌های برنج متفاوت باشد، به‌طوری که نتایج متفاوتی در رقم‌های برنج از نوع ایندیکا و ژاپونیکا گزارش شده است (Sasi *et al*., 2022).



شکل ۷-miRNAهای تنظیم کننده ژن‌های کلیدی شناسایی شده در برنج تحت شرایط تنش خشکی
Figure 7. MiRNAs regulating key genes identified in rice under drought stress conditions

نتیجه‌گیری کلی

در پژوهش حاضر، ژن‌های موثر در ایجاد تحمل نسبت به تنش خشکی در گیاه برنج بررسی و همچنین مسیرهای درگیر و miRNAهای تاثیرگذار در بیان ژن‌های مهم معرفی شد. نتایج نشان داد که ژن‌های خانواده *MCMs* بیش‌ترین تاثیر را در ایجاد تحمل به تنش خشکی در برنج داشتند. در بین ژن‌های کلیدی فاکتور رونویسی *NAC037* نیز وجود داشت. همچنین، ژن‌های *CDC6*، *RPA2A*، *POLA* و *PCNA* از ژن‌های کلیدی شناسایی شده بودند که در مسیرهایی مانند متابولیسم نشاسته و ساکارز، متابولیسم پورفیرین، بیوسنتز کاروتنوئید، سیستم سیگنال‌دهی فسفاتیدیل اینوزیتول، انتقال سیگنال هورمون گیاهی، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، مسیر سیگنال‌دهی MAPK، تثبیت کربن در موجودات فتوسنتزی، مسیر پنتوز فسفات، بیوسنتز کوفاکتورها، بیوسنتز اسیدهای چرب، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، بیوسنتز کوتین، سابرین و موم، فتوسنتز، مسیرهای متابولیک و همانندسازی DNA نقش داشتند. نتایج این مطالعه نشان داد که ژن‌های کلیدی توسط miRNA های مهمی از جمله osa-miR414، osa-miR2919، osa-miR5832، osa-miR5532، osa-miR2930، osa-miR2927 و osa-miR395x تنظیم می‌شوند. ژن‌های کلیدی و miRNA های شناسایی شده در این مطالعه می‌توانند برای ایجاد ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی در گیاه برنج مورد توجه قرار گیرند.

تضاد منافع

نویسندگان تایید می‌کنند که این تحقیق در غیاب هرگونه روابط تجاری یا مالی می‌تواند به عنوان تضاد منافع بالقوه تعبیر شود، انجام شده است.

رعایت اخلاق در نشر

نویسندگان اعلام می‌کنند که در نگارش این مقاله به‌طور کامل از اخلاق نشر از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و انتشار دوگانه، پیروی کرده‌اند. همچنین این مقاله حاصل یک کار تحقیقاتی اصیل بوده و تاکنون به‌طور کامل به هیچ زبانی و در هیچ نشریه یا همایشی چاپ و منتشر نشده است و هیچ اقدامی نیز برای انتشار آن در هیچ نشریه یا همایشی صورت نگرفته و نخواهد گرفت.

اجازه انتشار مقاله

نویسندگان با چاپ این مقاله به‌صورت دسترسی باز موافقت کرده و کلیه حقوق استفاده از محتوا، جدول‌ها، شکل‌ها، تصویرها و غیره را به ناشر واگذار می‌کنند.

References

Ali, W., Mao, K., Zhang, H., Junaid, M., Xu, N., Rasool, A., Feng, X., & Yang, Z. (2020). Comprehensive review of the basic chemical behaviours, sources, processes, and endpoints of trace element contamination in paddy soil-rice systems in rice-growing countries. *Journal of Hazardous Materials*, *397*, 122720. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122720.

Azimi, N., Ravash, R., & Zinati, Z. (2024). Microarray meta-analysis and supervised machine learning to explore drought-tolerance-associated genes in wheat (*Triticum aestivum*). *Genetic Resources & Crop Evolution*, *71*, 3815-3831. doi: 10.1007/s10722-024-01893-9.

Asres, L. A. (2023). Alternative techniques of irrigation water management for improving crop water productivity. *Reviews in Agricultural Science*, *11*, 36-53. doi: 10.7831/ras.11.0_36.

Baldrich, P., & San Segundo, B. (2016). MicroRNAs in rice innate immunity. *Rice*, *9*(1), 6. doi: 10.1186/s12284-016-0078-5.

Batool, T., Ali, S., Seleiman, M. F., Naveed, N. H., Ali, A., Ahmed, K., Abid, M., Rizwan, M., Shahid, M. R., & Alotaibi, M. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities. *Scientific Reports*, *10*(1), 16975. doi: 10.1038/s41598-020-73489-z.

Chandra, S., & Roychoudhury, A. (2020). Penconazole, paclobutrazol, and triacontanol in overcoming environmental stress in plants. In: Roychoudhury, A., & Tripathi, D. K. (Eds.). Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress: Biochemical and Molecular Perspectives. pp. 510-534. doi: 10.1002/9781119552154.ch26.

Das, B., Sen, A., Roy, S., Banerjee, O., & Bhattacharya, S. (2021). miRNAs: Tiny super-soldiers shaping the life of rice plants for facing "stress"-ful times. *Plant Gene*, *26*, 100281. doi: 10.1016/j.plgene.2021.100281.

Delarampoor, M. A., Fahmideh, L., & Fooladvand, Z. (2019). Effect of drought stress on NAC gene expression in some bread wheat cultivars of Sistan region. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, *12*(3), 649-662. [In Persian]. doi: 10.22077/escs.2019.1484.1361.

El-Esawi, M. A., & Alayafi, A. A. (2019). Overexpression of *StDREB2* transcription factor enhances drought stress tolerance in cotton (*Gossypium barbadense* L.). *Genes (Basel)*, *10*(2), 142. doi: 10.3390/genes10020142.

Gao, Z., Ma, C., Zheng, C., Yao, Y., & Du, Y. (2022). Advances in the regulation of plant salt-stress tolerance by miRNA. *Molecular Biology Reports*, *49*(6), 5041-5055. doi: 10.1007/s11033-022-07179-6.

Gill, S. S., Chahar, P., Macovei, A., Yadav, S., Ansari, A. A., Tuteja, N., & Gill, R. (2021). Comparative genomic analysis reveals evolutionary and structural attributes of MCM gene family in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *Journal of Biotechnology*, *327*, 117-132. doi: 10.1016/j.jbiotec.2020.12.010.

Gong, Z., Xiong, L., Shi, H., Yang, S., Herrera-Estrella, L. R., Xu, G., Chao, D.-Y., Li, J., Wang, P. -Y., Qin, F., Li, J., Ding, Y., Shi, Y., Wang, Y., Yang, Y., Guo, Y., & Zhu, J. -K. (2020). Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency. *Science China Life Sciences*, *63*, 635-674. doi: 10.1007/s11427-020-1683-x.

Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(8), 509-524. doi: 10.1038/nrm3838.

Huang, Q., Wang, Y., Li, B., Chang, J., Chen, M., Li, K., Yang, G., & He, G. (2015). *TaNAC29*, a NAC transcription factor from wheat, enhances salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, *15*, 268. doi: 10.1186/s12870-015-0644-9.

Jia, X., Zeng, Z., Lyu, Y., & Zhao, S. (2022). Drought-responsive NAC transcription factor *RcNAC72* is recognized by *RcABF4*, interacts with *RcDREB2A* to enhance drought tolerance in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1755. doi: 10.3390/ijms23031755.

Kamrava, S., Babaeian Jelodar, N. A., Bagheri, N. A., & Nazarian-Firouzabadi, F. (2024). Investigating the expression pattern of SAPK1 gene from protein kinase gene group (SNF1-Type) in rice plants under salt stress. *Journal of Crop Production*, *17*(1), 169-186. [In Persian]. doi: 10.22069/ejcp.2024.21425.2582.

Khorrami Moghadam, M., Khoshhal Sarmast, M., Ghasemnajad, A., & Savchenko, T. (2024). Mitigation of root and shoot proline content in response to jasmonic and salicylic acid in Rosa damacena subjected to short drought stress. *Journal of Plant Production Research*, *30*(4), 171-190. [In Persian]. doi: 10.22069/JOPP.2024.21547.3063.

Kohli, S. K., Handa, N., Sharma, A., Gautam, V., Arora, S., Bhardwaj, R., Wijaya, L., Alyemeni, M. N., & Ahmad, P. (2018). Interaction of 24-epibrassinolide and salicylic acid regulates pigment contents, antioxidative defense responses, and gene expression in *Brassica juncea* L. seedlings under Pb stress. *Environmental Science & Pollution Research*, *25*, 15159-15173. doi: 10.1007/s11356-018-1742-7.

Li, C., Nong, W., Zhao, S., Lin, X., Xie, Y., Cheung, M.-Y., Xiao, Z., Wong, A. Y., Chan, T. F., & Hui, J. H. (2022). Differential microRNA expression, microRNA arm switching, and microRNA:long noncoding RNA interaction in response to salinity stress in soybean. *BMC Genomics*, *23*(1), 65. doi: 10.1186/s12864-022-08308-y.

Li, M., & Yu, B. (2021). Recent advances in the regulation of plant miRNA biogenesis. *RNA Biology*, *18*(12), 2087-2096. doi: 10.1080/15476286.2021.1899491.

Li, C. Y., Cai, J.-H., Tsai, J. J., & Wang, C. C. (2020). Identification of hub genes associated with development of head and neck squamous cell carcinoma by integrated bioinformatics analysis. *Frontiers in Oncology*, *10*, 681. doi: 10.3389/fonc.2020.00681.

Ma, Y., Tang, M., Wang, M., Yu, Y., & Ruan, B. (2024). Advances in understanding drought stress responses in rice: Molecular mechanisms of ABA signaling and breeding prospects. *Genes*, *15*(12), 1529. doi: 10.3390/genes15121529.

Mahmoudi, A., Aalami, A., Hasani Komleh, H., Esfehani, M., & Shirzadian, R. (2018). Assessment of *NAC2*, *MYB* and *CBF14* genes expression in susceptible and resistant *Aegilops* genotypes to salinity. *Iranian Journal of Rangelands & Forests Plant Breeding & Genetic Research*, *26*(2), 244-253. [In Persian]. doi: 10.22092/ijrfpbgr.2018.117963.

Noman, A., & Aqeel, M. (2017). miRNA-based heavy metal homeostasis and plant growth. *Environmental Science & Pollution Research*, *24*, 10068-10082. doi: 10.1007/s11356-017-8593-5.

Pasandideh Arjmand, M., Farrokhi, N., Samizadeh Lahiji, H., & Mohsenzadeh Golfazani, M. (2024). Deciphering the regulatory network of some key drought-responsive genes and microRNAs in canola. *Journal of Genetic Resources*, *10*(1), 29-39. doi: 10.22080/jgr.2024.26535.1380.

Patel, P., Yadav, K., Ganapathi, T., & Penna, S. (2019). Plant miRNAome: Cross talk in abiotic stressful times. In: Rajpal, V. R., Sehgal, D., Kumar, A., & Raina, S. N. (Eds.). Genetic Enhancement of Crops for Tolerance to Abiotic Stress: Mechanisms and Approaches, Vol. I. Springer Cham. pp. 25-52. doi: 10.1007/978-3-319-91956-0_2.

Poursharifi, M. S., & Zarei, M. A. (2016). Alpha-glucosidase inhibitory activity in hexane extracts of some plants from Kurdistan province. *Journal of Medicinal Plants*, *15*(58), 120-133. dor: 20.1001.1.2717204.2016.15.58.3.1.

Sasi, J. M., VijayaKumar, C., Kukreja, B., Budhwar, R., Shukla, R. N., Agarwal, M., & Katiyar-Agarwal, S. (2022). Integrated transcriptomics and miRNAomics provide insights into the complex multi-tiered regulatory networks associated with coleoptile senescence in rice. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 985402. doi: 10.3389/fpls.2022.985402.

Seleiman, M. F., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y., Dindaroglu, T., Abdul-Wajid, H. H., & Battaglia, M. L. (2021). Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. *Plants*, *10*(2), 259. doi: 10.3390/plants10020259.

Shojaee, S., Ravash, R., Shiran, B., & Ebrahimie, E. (2020). Identification of a number of genes with different expression patterns between resistant and susceptible wheat cultivars in response to drought stress by using meta-analysis method. *Agricultural Biotechnology Journal*, *12*(3), 157-176. [In Persian]. doi: 10.22103/JAB.2020.15218.1194.

Shojaee, S., Ravash, R., Shiran, B., & Ebrahimie, E. (2022). Meta-analysis highlights the key drought responsive genes in genes: *PEPC* and *TaSAG7* are hubs response networks. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, *20*(1), 127. doi: 10.1186/s43141-022-00395-4.

Silva Filho, J. L. B. D., Pestana, R. K. N., Silva Júnior, W. J. D., Coelho Filho, M. A., Ferreira, C. F., de Oliveira, E. J., & Kido, E. A. (2024). Exploiting DNA methylation in cassava under water deficit for crop improvement. *PLoS One*, *19*(2), e0296254. doi: 10.1371/journal.pone.0296254.

Tuteja, N., Tran, N. Q., Dang, H. Q., & Tuteja, R. (2011). Plant MCM proteins: Role in DNA replication and beyond. *Plant Molecular Biology*, *77*, 537-545. doi: 10.1007/s11103-011-9836-3.

Asefpour Vakilian, K. (2019). Gold nanoparticles-based biosensor can detect drought stress in tomato by ultrasensitive and specific determination of miRNAs. *Plant Physiology & Biochemistry*, *145*, 195-204. doi: 10.1016/j.plaphy.2019.10.042.

Yin, J., Liu, Y., Lu, L., Zhang, J., Chen, S., & Wang, B. (2022). Comparison of tolerant and susceptible cultivars revealed the roles of circular RNAs in rice responding to salt stress. *Plant Growth Regulation*, *96*, 243-254. doi: 10.1007/s10725-021-00772-y.

Yousfi, S., Márquez, A. J., Betti, M., Araus, J. L., & Serret, M. D. (2016). Gene expression and physiological responses to salinity and water stress of contrasting durum wheat genotypes. *Journal of Integrative Plant Biology*, *58*(1), 48-66. doi: 10.1111/jipb.12359.

Zhang, B., & Chen, X. (2021). Secrets of the *MIR172* family in plant development and flowering unveiled. *PLOS Biology*, *19*(2), e3001099. doi: 10.1371/journal.pbio.3001099.

Zhang, C., Yang, H., Wu, W., & Li, W. (2017). Effect of drought stress on physiological changes and leaf surface morphology in the blackberry. *Brazilian Journal of Botany*, *40*, 625-634. doi: 10.1007/s40415-017-0377-0.

Zhang, F., Yang, J., Zhang, N., Wu, J., & Si, H. (2022a). Roles of microRNAs in abiotic stress response and characteristics regulation of plant. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 919243. doi: 10.3389/fpls.2022.919243.

Zhang, X., Li, W., Liu, Y., Li, Y., Li, Y., Yang, W., Chen, X., Pi, L., & Yang, H. (2022b). Replication protein *RPA2A* regulates floral transition by cooperating with *PRC2* in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, *235*(6), 2439-2453. doi: 10.1111/nph.18279.

Zhang, Y., Chen, Q., Zhu, G., Zhang, D., & Liang, W. (2022c). Chromatin-remodeling factor *CHR721* with non-canonical PIP-box interacts with *OsPCNA* in Rice. *BMC Plant Biology*, *22*(1), 164. doi: 10.1186/s12870-022-03532-w.