

Evaluation of transcription response to drought stress in rice using RNA-seq meta-analysis

Shima Karami

Ph.D. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. E-mail address: sh32karami@gmail.com

Behrouz Shiran 

*Corresponding author. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. E-mail address: beshiran45@gmail.com

Rudabeh Ravash 

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. E-mail address: r.ravash@gmail.com

Hossein Fallahi 

Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran. E-mail address: fallahi.raziuni@gmail.com

Arghavan Alisoltani

Assistant Professor, University of California Riverside School of Medicine, Riverside, California, USA. E-mail address: arghavana85@gmail.com

Abstract

Objective

Understanding the molecular mechanisms of response to stress such as drought can significantly improve the science of plant molecular breeding. Transcriptomic studies can make a large amount of information available to researchers. Integrating such data from different sources through advanced statistical methods such as meta-analysis provides a new opportunity to overcome biological complexity, identify differentially expressed genes (DEGs), and obtain more reliable results. The present study aimed to identify DEGs in response to drought stress using transcriptomic data through a meta-analysis of RNA-seq data.

Materials and methods

RNA-seq data were downloaded from the EMBL-EBI database and after preprocessing, high-quality reads were mapped on the rice reference genome with the STAR software. Differential expression genes were evaluated separately for each dataset using the edgeR package. The outputs were used for meta-analysis using the metaRNAseq package. Genes with different and significant expressions in response to drought stress were examined for functional enrichment, biological pathways, and protein interaction. Finally, hub genes were identified.

Results

According to the meta-analysis results, 6607 differential expression genes with average $\log_2FC \geq |1|$ And $FDR \leq 0.05$ were detected. 3313 and 3294 of them were regulated up and down, respectively, and 162 genes were not identified as DEG in individual analyzes and were identified only by meta-analysis, which shows the statistical power of this method in identifying new genes. The results of functional enrichment of DEGs indicate the induction of various metabolic pathways under stress including biosynthesis of secondary metabolites and amino acids, carbohydrate metabolism, and plant hormone signal transduction. Investigation of protein interaction and identification of hub genes also showed their role in stress response, oxidoreductase activity, and amino acid metabolism.

Conclusions

This study can increase our understanding of the molecular mechanisms of rice response to drought stress and be useful in identifying key and new genes, even as molecular markers to improve drought stress tolerance in rice breeding programs.

Keywords: Drought stress, RNA-seq, Meta-analysis, Rice.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Karami Sh, Shiran B, Ravash R, Fallahi H, Alisoltani A (2022) Evaluation of Transcription Response to Drought Stress in Rice Using RNA-seq Meta-analysis. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (4), 221-246.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (4), 221-246. DOI: 10.22103/jab.2022.19691.1411

Received: October 23, 2022.

Received in revised form: November 23, 2022.

Accepted: November 24, 2022.

Published online: November 30, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant



Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.

© the authors

ارزیابی پاسخ به تنش خشکی در سطح رونویسی در برنج با استفاده از فراتحلیل داده‌های

RNA-seq

شیمای کرمی


دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. رایانامه: sh32karami@gmail.com

 بهروز شیران

*نویسنده مسئول: استاد تمام، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. رایانامه: beshiran45@gmail.com

 رودابه راوش

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. رایانامه: r.ravash@gmail.com

 حسین فلاحی

دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. رایانامه: fallahi.raziuni@gmail.com

ارغوان علی سلطانی

استادیار، دانشکده پزشکی دانشگاه کالیفرنیا، ریورساید، کالیفرنیا، ایالات متحده. رایانامه: arghavana85@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۹ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۰/۱۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۷

چکیده

هدف: درک مکانیسم‌های مولکولی پاسخ به تنش از جمله تنش خشکی می‌تواند به‌طور قابل توجهی علم اصلاح مولکولی گیاهان را ارتقا بخشد. مطالعات ترنسکریپتومی می‌تواند حجم زیادی از اطلاعات را در دسترس محققان قرار دهد. ادغام چنین اطلاعاتی از منابع مختلف از طریق روش‌های آماری پیشرفته مانند فراتحلیل فرصت جدیدی برای غلبه بر پیچیدگی بیولوژیکی، شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت (DEGs) و کسب نتایج قابل اعتمادتر، فراهم می‌آورد. مطالعه حاضر با هدف شناسایی DEGs در پاسخ به تنش خشکی با استفاده از داده‌های ترنسکریپتومی از طریق فراتحلیل داده‌های RNA-seq انجام شد.

مواد و روش‌ها: داده‌های RNA-seq از پایگاه داده EMBL-EBI دانلود شد و پس از پیش پردازش، نقشه‌یابی خوانش‌های با کیفیت بر روی ژنوم مرجع برنج با نرم افزار STAR صورت گرفت. تغییرات بیان ژن‌ها با استفاده از پکیج edgeR به صورت جداگانه برای هر مجموعه داده بررسی و سپس از خروجی حاصله برای فراتحلیل با استفاده از پکیج metaRNAseq استفاده شد. ژن‌های با بیان متفاوت و معنادار در پاسخ به تنش، از نظر عملکرد زیستی، مسیرهای زیستی درگیر و برهم‌کنش پروتئینی بررسی شد و در نهایت ژن‌های کلیدی در پاسخ به تنش خشکی تعیین گردید.

نتایج: مطابق نتایج فراتحلیل ۶۶۰۷ ژن با متوسط بیان $\log_2FC \geq |1|$ و $FDR \leq 0.05$ شناسایی شد که به ترتیب ۳۳۱۳ و ۳۲۹۴ از آن‌ها تحت تنش، بیان‌شان افزایش و کاهش یافته است. از این تعداد ۱۶۲ ژن در آنالیزهای انفرادی به‌عنوان DEG تعیین نشده بودند و تنها از طریق فراتحلیل شناسایی شدند، که این امر نشان‌دهنده قدرت آماری این روش در شناسایی ژن‌های جدید است. نتایج بررسی عملکردی DEG‌ها نشان‌دهنده القای مسیرهای متابولیکی مختلف از جمله بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و اسیدهای آمینه، متابولیسم کربوهیدرات‌ها و مسیر انتقال پیام فیتوهورمون‌ها تحت تنش است. بررسی برهم‌کنش پروتئینی و شناسایی ژن‌های کلیدی نیز حاکی از نقش آن‌ها در پاسخ به تنش، فعالیت اکسیدوردوکتازی و متابولیسم اسید آمینه بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه می‌تواند درک ما را از مکانیسم‌های مولکولی پاسخ برنج به تنش خشکی افزایش دهد و همچنین در شناسایی ژن‌های کلیدی و جدید، حتی به‌عنوان نشانگرهای مولکولی در راستای بهبود تحمل به تنش خشکی در برنامه‌های اصلاحی برنج مفید باشد.

کلیدواژه‌ها: تنش خشکی، RNA-seq، فراتحلیل، برنج.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: کرمی شیما، شیران بهروز، راوش رودابه، فلاحی حسین، علی سلطانی ارغوان (۱۴۰۱) ارزیابی پاسخ به تنش خشکی در سطح رونویسی در برنج با استفاده از فراتحلیل داده‌های RNA-seq. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۴(۴)، ۲۴۶-۲۲۱.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

برنج (*Oryza sativa*) یکی از گونه‌های گیاهی مدل و یکی از اصلی‌ترین محصولات غذایی در میان غلات برای حدود نیمی از جمعیت جهان به شمار می‌رود. تولید پر بازده برنج نیازمند مصرف مقدار زیادی آب است. بنابراین خشکی دلیل اصلی کاهش عملکرد و محدودیت کشت آن در مناطق مختلف در سراسر جهان است (Lv et al. 2019). درک چگونگی پاسخ برنج به

خشکی و تاثیر کمبود آب بر روند اصلی رشد آن، برای ایجاد انواع متحمل یا مقاوم این گیاه از اهمیت زیادی برخوردار است (Galbiati et al. 2016).

گیاهان مکانیسم‌های مختلفی را برای مقابله با تنش خشکی در سطوح مختلف از قبیل مولکولی، سلولی، بافت، آناتومی، مورفولوژیکی و فیزیولوژی به کار می‌برند. در برنج نیز به دلیل وجود تنوع ژنتیکی مناسب در انواع سنتی و مدرن آن در برابر خشکی، بستر مناسبی برای تحقیقات بیولوژیکی به منظور کشف نکاتی در مورد مکانیسم‌های اساسی ژنتیکی پاسخ به خشکی، فراهم آمده است (Ereful et al. 2020). استفاده از الگوی بیان ژنی، یک روش مناسب برای شناخت بهتر مکانیسم‌های واکنش گیاهان به تنش‌ها از طریق شناسایی مسیرها و ژن‌های تنظیم‌کننده پاسخ به تنش است (Prabu et al. 2010; Shaar-Moshe et al. 2015). در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی^۱ یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ‌گاه به‌طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آن‌ها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Arabpour et al. 2021). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند (Mohammadabadi 2020). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *E. coli* کشف شد (Mohammadabadi et al. 2021). بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می‌باشد (Masoudzadeh et al. 2020). تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است (Shahsavari et al. 2021). همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi 2021). یکی از اقدامات اساسی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آن‌ها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadabadi and Soflaei 2020). علاوه بر این، شناسایی این ژن‌ها اطلاعات مفیدی را به منظور تعیین خصوصیات ژن‌های کلیدی فراهم می‌سازد (Lv et al. 2019).

ظهور رویکردهای مدرن مانند توالی‌یابی نسل جدید، انقلابی در تجزیه و تحلیل ژنتیکی و ترنسکریپتومی محصولات مهم از جمله برنج ایجاد کرده است (Ereful et al. 2020). امروزه حجم زیادی داده زیستی با استفاده از روش‌های همچون توالی‌یابی RNA که مرتبط با انواع مهم پاشخ گیاهان به تنش‌ها هستند، به دست آمده است که این امر امکان مطالعه همزمان بیان هزاران ژن و الگوی بیانی آن‌ها تحت شرایط مختلف را برای محققان فراهم می‌سازد (Ashrafi-Dehkordi et al. 2018).

^۱. DNA

تکرارپذیری نتایج، یک مشکل عمده در آزمایش‌های با حجم بالای داده مانند تجزیه و تحلیل بیان ژن است که در آن به‌طور همزمان هزاران فرضیه در حال آزمایش است. با توجه به هزینه تعیین توالی، آزمایشات توالی‌یابی RNA (RNA-seq) معمولاً بر روی تعداد کمی از تکرارهای بیولوژیکی انجام می‌شود که قدرت آن‌ها را در تشخیص DEGها محدود می‌سازد. علاوه بر این، تنوع بین مطالعات به دلیل تفاوت‌های تکنیکی از قبیل نحوه آماده‌سازی نمونه، پروتکل‌های ساخت کتابخانه RNA-seq و اثرات دسته‌ای و همچنین تفاوت‌های بیولوژیکی مانند اثرات محیطی و ژنتیکی، منجر به افزایش مشکل عدم تکرارپذیری و حتی ایجاد نتایج متفاوت و یا متناقض می‌شود. یکی از راه‌های بهبود تکرارپذیری، ادغام مجموعه داده‌های متعدد از چندین مطالعه مستقل از طریق فراتحلیل است. فراتحلیل می‌تواند با حذف نتایج مثبت کاذب مرتبط با شرایط و طرح اجرای آزمایش، به بهبود یافته‌های پژوهشی در این نوع مطالعات کمک کند. علاوه بر این، ادغام داده‌های حاصل از آزمایش‌های متعدد امکان دستیابی به بینش بیولوژیکی عمیق‌تری را در مقایسه با نتایج مطالعات منفرد، فراهم می‌سازد و به تولید نتایج معتبرتری منجر می‌شود (Shaar- Moshe et al. 2015; Keel et al. 2018). ترکیبی از مقادیر P-valueها روش رایجی در فراتحلیل است که در بسیاری از مطالعات استفاده شده است (Rest et al. 2016; Ashrafi-Dehkordi et al. 2018). با توجه به دردسترس بودن داده‌های حاصل از ریزآرایه و RNA-seq مطالعات مختلف، امروزه روش‌های فراتحلیل در مطالعات بیان ژن در زمینه‌های پزشکی و سایر زمینه‌های تحقیقاتی از جمله پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی مورد استفاده قرار گرفته است.

در یک مطالعه با هدف شنا سایی ژن‌های کلیدی پاسخ‌دهنده به شوری و درک مکانیسم پاسخ مولکولی برنج در مرحله گیاهچه‌ای از طریق مجموعه داده‌های ریزآرایه دردسترس، با استفاده فراتحلیل، تعداد ۵۵۵۹ ژن به‌عنوان ژن‌های با بیان متفاوت که در مسیرهای مختلف زیستی از جمله مسیر انتقال سیگنال و مسیر انتقال پیام هورمون تحت تنش شوری نقش داشتند، شناسایی شدند که در این میان برخی ژن‌های پاسخ‌دهنده به شوری که در مطالعات پیشین گزارش نشده بودند نیز شناسایی شد (Kong et al. 2019). در مطالعه‌ی دیگر نیز به‌منظور شناسایی ژن‌های کلیدی در پاسخ به تنش سرما در گونه‌های مختلف گیاهی از فراتحلیل با استفاده از داده‌های RNA-Seq حاصل از مطالعات منتشر شده پیشین بهره گرفته شد و نتایج آن نشان‌دهنده اهمیت نقش اتیلن در پاسخ متقابل هورمونی در برابر تنش سرما، به‌ویژه در گونه‌های حساس بود (Vergata et al. 2022). اگرچه مطالعات وسیعی بر روی بررسی بیان ژن در گیاهان مختلف صورت گرفته و در سال‌های اخیر نیز از روش فراتحلیل با کمک داده‌های ریزآرایه بهره گرفته شده است. در مطالعه حاضر سعی شده است که از طریق فراتحلیل با استفاده از داده‌های RNA-Seq که اطلاعات بیشتری را نسبت به سایر روش‌های مطالعه ترنسکرپتوم در اختیار ما قرار می‌دهد، به درک بهتری از پاسخ گیاه برنج به تنش خشکی دست یابیم. علاوه بر این به بررسی ژن‌های مشترک کلیدی و شناسایی ژن‌های جدیدی که در طی مطالعات انفرادی شناسایی نشده‌اند، پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری داده‌های RNA-Seq: به منظور دستیابی به داده‌های مورد نیاز برای انجام فراتحلیل از کلید واژه‌های تنش خشکی، تنش آبی و برنج جهت جستجو در پایگاه داده‌ی NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/docs>) استفاده شد و در میان نتایج به دست آمده تنها نمونه‌های مربوط به تنش خشکی در برنج که از پلت فرم‌های توالی‌یابی و بافت نمونه برداری یکسانی (برگ) برخوردار بودند، انتخاب گردید. در نهایت ۱۸ کتابخانه RNA-Seq از مجموعه داده‌های با شماره دسترسی SRP071248 و SRP042233 انتخاب و در چهار مطالعه دسته بندی شد. مجموعه داده‌ی SRP071248 حاصل از مطالعه‌ای است که به بررسی اثرات تنش خشکی در گیاهان برنج رشد یافته در طول روزهای مختلف (روز کوتاه و روز بلند) پرداخته است. این مجموعه داده شامل ۱۲ کتابخانه‌ی RNA-Seq شامل دو نمونه کنترل و دو نمونه تنش در سه تکرار است که توسط پلتفرم Illumina HiSeq 2000 توالی‌یابی شده است (Galbiati et al. 2016). در پژوهش حاضر کتابخانه‌های مرتبط با شرایط رشد در طول روز بلند و روز کوتاه هر کدام به عنوان مطالعه‌های جداگانه در نظر گرفته شد. از مجموعه داده‌ی SRP042233 نیز که توسط پلتفرم Illumina HiSeq 2000 توالی‌یابی شده، شش کتابخانه RNA-Seq شامل نمونه کنترل و دو سطح تنش خشکی یک و سه روز در دو تکرار مورد استفاده قرار گرفت. هر کدام از سطوح تنش نیز به عنوان یک مطالعه جداگانه در نظر گرفته شد. فایل داده‌های خام آن‌ها با فرمت fastq از بخش ENA (European Nucleotide Archive) پایگاه داده EMBL (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>) EBI دانلود گردید.

پردازش داده و بررسی بیان ژن: به منظور بررسی بیان ابتدا کیفیت داده‌های خام دانلود شده با استفاده از ابزار FastQC نسخه ۰,۱۱,۸ (Andrews 2017) کنترل گردید و از ابزار Trimmomatic نسخه ۰,۳۶ (Bolger et al. 2014) به منظور حذف توالی آدپتور و بازهای با کیفیت پایین استفاده شد. سپس خوانش‌های با کیفیت بالا از طریق نرم افزار STAR نسخه ۲,۶,۰a (Dobin, et al. 2013) به ژنوم مرجع برنج نقشه‌یابی گردید. جهت تهیه ژنوم مرجع، فایل ژنوم برنج و فایل حاشیه نویسی آن با فرمت GFF3 از پایگاه داده Ensembl (https://plants.ensembl.org/Oryza_sativa/Info/Index) دانلود شد. در نهایت از پکیج edgeR در محیط R برای نرمال‌سازی داده‌ها بر اساس میانگین‌های پیرایش شده مقادیر M^2 (TMM) و شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت در هر مطالعه به صورت جداگانه استفاده شد. لازم به ذکر است تمامی مراحل در محیط دستوری سیستم عامل لینوکس ابونتو (ubuntu) صورت گرفته است.

فراتحلیل (متاآنالیز): خروجی بررسی بیان هر مجموعه داده که شامل داده‌های بیان و p-value بود، برای فراتحلیل با استفاده از پکیج metaRNAseq در محیط R، مورد استفاده قرار گرفت. در پکیج metaRNAseq از روش فیشر (Fisher) برای ترکیب p-value و شناسایی ژن‌های افزایش یا کاهش بیان یافته بین دو حالت در طول تمام مجموعه داده‌ها استفاده

۲. Trimmed Mean of M-values

می شود. در این روش p-valueها برای هر ژن از مطالعات جداگانه با استفاده از رابطه ۱ ترکیب می شود (Alimadadi et al. 2020).

$$F_g = -2 \sum_{s=1}^s \ln(p_{gs}) \quad \text{رابطه ۱}$$

در اینجا p_{gs} مربوط به p-value محاسبه شده برای یک ژن (g) در تجزیه و تحلیل بیان هر مطالعه (s) است. F_g نیز توزیع کای (χ^2) با درجه آزادی ۲S است (S = تعداد مطالعه‌های مورد استفاده). مطابق رابطه p-valueهای کوچکتر منجر به F_g بزرگتری خواهد شد و در نتیجه فرضیه صفر رد خواهد شد. مقادیر p-value برای میزان کشف اشتباه (FDR) به روش بنجامین - هو شبرگ تصحیح گردید و مقدار p-value تعدیل شده ≤ 0.05 (adjusted p-value) از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. در نهایت ژن‌هایی که $FDR < 0.05$ و میانگین تغییر بیان در آن‌ها (\log_2 Fold change (\log_2FC)) بزرگتر و کوچکتر از ۱ و -۱ بود، به عنوان ژن‌های با بیان متفاوت در فراتحلیل در نظر گرفته شدند و از این پس با عنوان متاژن از آن‌ها یاد می‌شود. نمودار ون از تعداد ژن‌های افزایش و کاهش بیان یافته در مطالعات مجزا و حاصل از فراتحلیل با استفاده از ابزار تحت وب InteractiVenn (www.interactivenn.net) (Heberle et al. 2015) ترسیم شد.

آنالیز غنی سازی عملکردی: آنالیز هستی‌شناسی (ژن‌آنتولوژی) متاژن‌ها بر اساس عملکرد مولکولی، فرآیند بیولوژیکی و اجرای سلولی با استفاده از ابزار SEA، agriGO (نسخه ۲،۰) با تنظیمات پیش فرض (p -value, $FDR < 0.01$) انجام و مشخصات هستی‌شناسی متاژن‌ها با پروفایل هستی‌شناسی ژنی مجموعه مرجع مقایسه شد (Tian et al. 2017). به منظور شناسایی مسیرهای مهم نیز آنالیز مسیر با استفاده از پایگاه داده Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) انجام گردید.

آنالیز شبکه و تعیین ژن‌های هاب یا سخ دهنده به تنش خشکی: آنالیز شبکه با استفاده از بررسی برهم کنش پروتئین-پروتئین توسط ابزار تحت وب STRING (<https://string-db.org>) انجام و با استفاده از ابزار Network Analyzer که به صورت پیش فرض در نرم‌افزار Cytoscape (نسخه ۳،۷،۲) در دسترس است، ترسیم و تحلیل شد (Shannon et al. 2003). ژن‌های مؤثر در این شبکه نیز با استفاده از پلاگین Cyto-Hubba در نرم‌افزار Cytoscape تعیین گردید.

نتایج و بحث

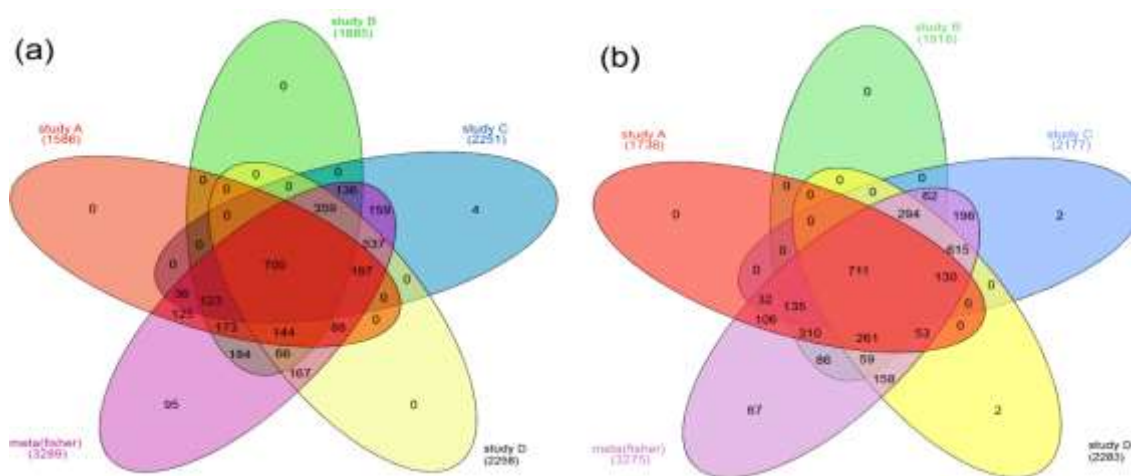
شناسایی DEGs با استفاده از فراتحلیل: با توجه به اینکه شرایط مورد بررسی هیچ دو مطالعه‌ای کاملاً یکسان نیست ادغام نتایج مطالعات از طریق فراتحلیل ضمن شناسایی ژن‌های جدید این امکان را فراهم می‌سازد که با شناسایی ژن‌های مشترک در طول تمام مطالعات با حذف تاثیر شرایط انجام آزمایش به نتایج قطعی و معتبرتری دست یافت. از این رو جهت شناسایی

DEGهای مشترک در مجموعه داده‌های این مطالعه و همچنین شناسایی ژن‌های جدید، فراتحلیل با استفاده از مطالعات RNA-seq انجام شد.

در مطالعه حاضر نتایج فراتحلیل منجر به شناسایی ۶۶۰۷ ژن با متوسط تغییر بیان برابر ۲ و بیشتر ($\log_2FC \geq |1|$) و $p\text{-value} \leq 0.05$ گردید. از این تعداد ۳۳۱۳ و ۳۲۹۴ ژن به ترتیب در طی تنش، بیانشان افزایش و کاهش یافت. تعداد ۷۰۰ و ۷۱۱ مورد از ژن‌های افزایش و کاهش بیان یافته، در بین تمام مطالعات انفرادی و فراتحلیل مشترک بود (شکل ۱). در میان ژن‌های افزایش بیان یافته ۱۱۳ ژن دارای میانگین تغییرات بیانی بیش از ۵ برابر ($\log_2FC \geq 5$) بودند، از جمله ژن‌های کدکننده پروتئین تجمع‌کننده در اواخر دوره جنینی (LEA)، پروتئین‌های خانواده دهیدرین، لیپید ترانسفراز (LTP) و پروتئین شوک حرارتی (HSP70). از طرفی ۱۶۲ ژن شامل ۹۵ ژن افزایش بیان یافته و ۶۷ ژن کاهش بیان یافته تنها از طریق فراتحلیل شناسایی شد که در آنالیزهای انفرادی به‌عنوان DE تعیین نشده بودند (شکل ۱). این امر نشان می‌دهد فراتحلیل قدرت آماری شناسایی ژن‌های جدید مرتبط با تنش را افزایش می‌دهد، همانطور که در مطالعات پیشین نیز به این ویژگی به‌عنوان مزیت فراتحلیل اشاره شده است (Rau et al. 2014). از جمله این ژن‌های جدید شناسایی شده می‌توان به ژن کدکننده پروتئین شبه فرمین (*OsFH4*)، پروتئین متصل‌شونده به Ran (*RanBP*)، پروتئین‌های در بردارنده‌ی دمین *NB-ARC*، ژن‌های پروتئین شبه *G1* (*OsGIL9*) و سرین/تروتونین-پروتئین کیناز *STY46* که عملکرد بیولوژیکی آن‌ها در پاسخ به محرک‌های زیستی و غیرزیستی است، اشاره کرد. فرمین‌ها گروهی از پروتئین‌ها در یوکاریوت‌ها هستند که لازمی بسیاری از فرآیندهای مرتبط با اکتین، مانند سیتوکینز، تقسیم و حفظ قطبیت سلولی، در بسیاری از موجودات هستند (Yi et al. 2005). در مطالعه‌ای که به بررسی ژن‌های خانواده فرمین در گندم پرداخته، نشان داده شد که بیان ژن‌های فرمین در پاسخ به تیمارهای خشکی، شوری و ABA القا می‌شود. بررسی نواحی تنظیمی این ژن‌ها نشان‌دهنده وجود عناصر پاسخ‌دهنده مختلف از جمله پاسخ‌دهنده به تنش در نواحی پرموتری این ژن‌ها بود که این امر می‌تواند تایید کننده‌ی نقش‌های عملکردی مختلف ژن‌های خانواده فرمین از جمله مقاومت به تنش‌های غیرزیستی و پاسخ به هورمون‌ها از طریق مکانیسم‌های مختلف، در گیاهان باشد (Duan et al. 2021).

پروتئین‌های در بردارنده‌ی دمین *NB-ARC* همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد یکی از ژن‌های جدید شناسایی شده توسط فراتحلیل در این مطالعه است. دمین *NB-ARC* یک موتیف سیگنال‌دهی است که در باکتری‌ها و یوکاریوت‌ها یافت می‌شود و تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی، نقش مهمی در تنظیم چندین فرآیند و مسیر متابولیک حیاتی در گیاهان ایفا می‌کند. بیشتر ژن‌های *NB-ARC* گیاهی در مقابله با پاسخ به حملات پاتوژنی عمل می‌کنند. پروتئین‌های مقاوم (R) در گیاهان که در شناسایی پاتوژن و متعاقب آن فعال‌سازی پاسخ‌های ایمنی در گیاه نقش دارند، اکثراً حاوی یک دمین مرکزی اتصال به نوکلئوتید موسوم به *NB-ARC* هستند که یک دمین عملکردی ATPase است و چگونگی اتصال نوکلئوتیدی آن در تنظیم فعالیت پروتئین R نقش دارد (Van Ooijen et al. 2008). علاوه بر این گزارش شده است که دمین‌های *NB-ARC* در پاسخ به مقاومت به تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی نقش دارند (Klaas et al. 2019).

پروتئین هسته‌ای مرتبط با Ras (Ran) به‌عنوان یکی دیگر از ژن‌های جدید شناسایی شده توسط فراتحلیل، یک GTPase کوچک است که نقش مهمی در نقل و انتقالات نوکلئوسیتوپلاسمی، پیشرفت چرخه تقسیم سلولی میتوزی از جمله تشکیل دوک تقسیم و چیدمان^۳ پویش هسته‌ای در گیاهان دارد. RanBP در همکاری با Ran یکی از عوامل مهم در پیشرفت چرخه سلولی هستند (Kim et al. 2001)، علاوه بر این، در مطالعات بر نقش آن‌ها در پاسخ به تنش‌ها تأکید شده است، برای مثال گیاهانی که *OsRAN1* و *OsRAN2* در آن‌ها بیش بیان شده است به دمای پایین مقاوم بوده‌اند (Chen et al. 2011). از طرفی دیگر بیش بیان *OsRAN2* در آرابیدوپسیس و برنج منجر به پاسخ فوق حساسیت تحت تنش شوری و اسمزی شده است (Zang et al. 2010). بررسی دو ژن *Ran GTPase TaRAN1* و *TaRAN2* در گندم نشان‌دهنده تنظیم متفاوت آن‌ها در مراحل مختلف رشدی و تحت تنش‌های غیرزیستی است. از این‌رو می‌توان نتیجه گرفت پروتئین‌های Ran رشد و نمو گیاه را از طریق فرآیندهای سلولی خود تنظیم می‌کنند و ممکن است نقش‌های متفاوتی را در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی در گیاهان ایفا کنند. از آنجاکه این تنش‌ها بر رشد و نمو گیاهان تأثیر می‌گذارد و به متعاقب آن عملکرد گیاهان زراعی را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد، حفظ رشد و بقای گیاهان طی شرایط تنش یکی از جنبه‌های مهم حفظ پایداری عملکرد گیاهان است. با توجه به این‌که حفظ تقسیم سلولی نقش مهمی در رشد و نمو گیاهان دارد، شناسایی ژن‌های دخیل در این امر و بررسی پاسخ آن‌ها در شرایط تنش‌های غیرزیستی از اهمیت بالایی برخوردار است (Choudhury 2021).



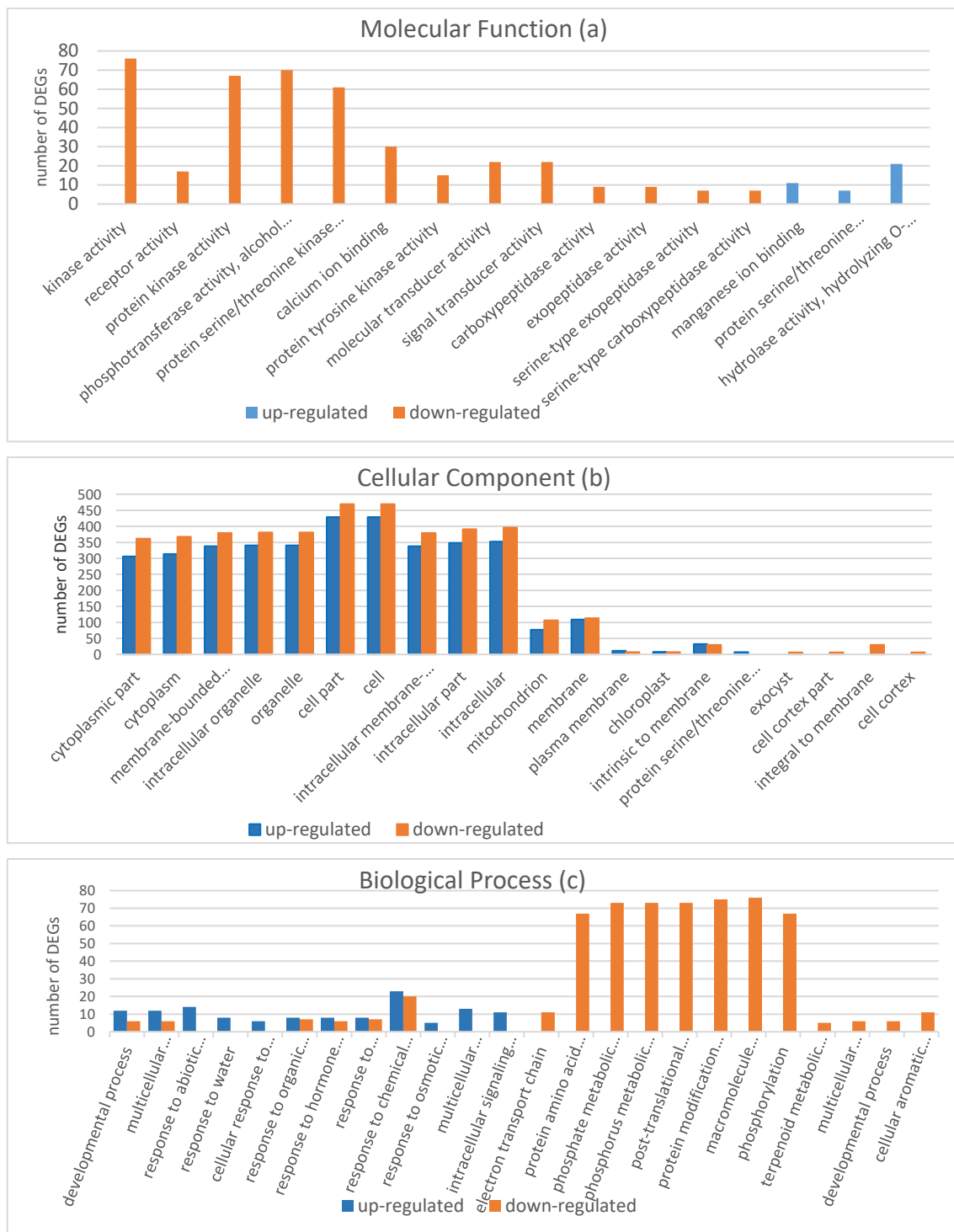
شکل ۱. آنالیز نمودار ون ژن‌های افزایش (a) و کاهش بیان یافته (b) در چهار مطالعه انفرادی و فراتحلیل

Figure 1. Venn diagram of upregulated (a) and downregulated (b) genes in four individual study and Meta-analysis (Fisher method)

^۳. Assembly

دسته‌بندی عملکردی متاژن‌ها: به‌منظور بررسی و شناسایی عملکرد متاژن‌ها، آنالیز آنتولوژی ژن برای ژن‌های افزایش و کاهش یافته به‌طور جداگانه با استفاده از ابزار تحت وب AgriGO انجام شد. تمرکز اصلی بر روی ۱۴۱۱ ژنی بود که به صورت مشترک در تمام مطالعات بیان شده بود و همچنین ۱۶۲ ژنی که تنها از طریق فراتحلیل شناسایی شد. براساس نتایج ژن آنتولوژی، از مجموع ۷۹۵ متاژن افزایش بیان یافته ۵۵۱ ژن و از ۷۷۸ متاژن کاهش بیان یافته ۵۷۳ ژن به‌ترتیب در ۳۱ و ۵۰ عنوان در دسته‌های عملکرد مولکولی، اجزای سلولی و فرآیند بیولوژیکی دسته‌بندی شدند (شکل ۲). از جمله مهم‌ترین آن‌ها در دسته فرآیند بیولوژیکی می‌توان به پاسخ به آب ((response to water (GO:0009415)، پاسخ به محرک غیرزیستی ((GO:0009628) پاسخ به تنش اسمزی ((response to osmotic stress (GO:0006970) و آب‌شار سیگنال‌دهی درون سلولی ((intracellular signaling cascade (GO:0007242) برای متاژن‌های افزایش بیان یافته و برای متاژن‌های کاهش بیان یافته به تغییر ماکرومولکول‌ها ((macromolecule modification (GO:0043412)، فرآیند اصلاح پروتئین ((protein modification process (GO:0006464) و فرآیند متابولیکی فسفات ((GO:0006796) phosphate metabolic process) با بیشترین تعداد ژن اشاره کرد.

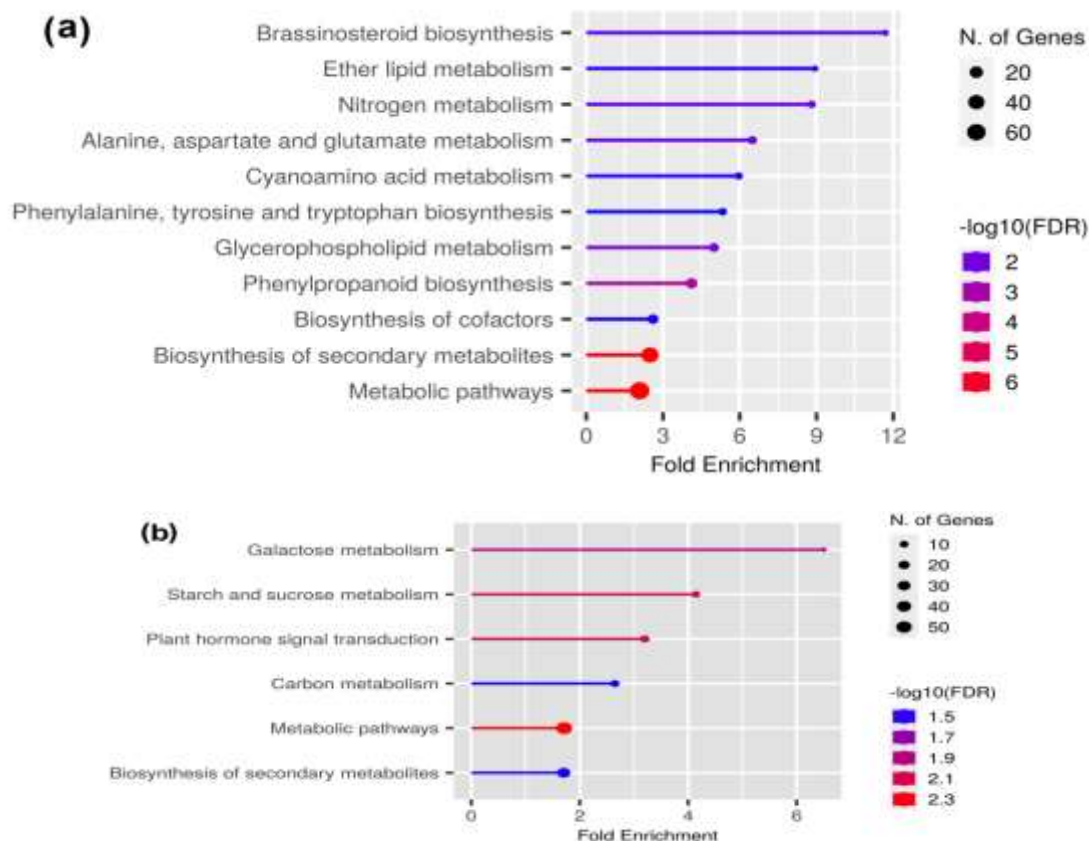
در دسته عملکرد مولکولی نیز متاژن‌های افزایش بیان یافته به‌طور معنی‌داری در سه زیردسته اتصال یون منگنز (manganese ion binding (GO:0030145) فعالیت پروتئین سرین/ترئونین فسفاتاز ((protein (GO:0004722) serine/threonine phosphatase activity) و فعالیت هیدرولاز/هیدرولیز ترکیبات O-گلیکوزیل ((GO:0004553) (serine/threonine phosphatase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds) غنی شدند. این در حالی است که متاژن‌های کاهش بیان یافته در ۱۳ زیردسته غنی شدند که پنج مورد از مهم‌ترین آن‌ها با بیشترین تعداد ژن عبارتند از فعالیت کینازی ((kinase activity (GO:0016301)، فعالیت فسفوترانسفرازی ((phosphotransferase activity (GO:0016773) (protein kinase activity (GO:0004672)، فعالیت پروتئین سرین/ترئونین کیناز ((protein serine/threonine kinase activity (GO:0004674) و اتصال یون کلسیم ((calcium ion binding (GO:0005509). در دسته اجزای سلولی نیز متاژن‌های افزایش و کاهش بیان یافته به ترتیب در ۱۱ و ۱۹ زیردسته غنی شدند. سلول ((cell (GO:0044464) و اجزای سلول ((cell part (GO:0005623)، اجزای داخل سلولی ((intracellular part (GO:0044424)، داخل سلول ((intracellular (GO:0005622) و اندامک ((organelle (GO:0043226) از مهم‌ترین زیردسته‌های با بیشترین تعداد ژن در هر دو گروه از متاژن‌ها بود.



شکل ۲. آنالیز غنی سازی هستی شناسی متاژن ها در سه دسته عملکردهای مولکولی (a) و اجزای سلولی (b) و فرایند بیولوژیکی (c)

Figure 2. Gene ontology enrichments analysis of Meta-genes in three categories: molecular functions (a), cellular component (b) and biological process (c)

تجزیه تحلیل غنی سازی مسیر KEGG نیز نشان داد که متاژن‌های افزایش و کاهش بیان یافته به ترتیب در ۶۹ و ۷۶ مسیر غنی شدند. متاژن‌های افزایش بیان یافته عمدتاً در مسیرهای متابولیکی، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، مسیر انتقال پیام هورمون‌های گیاهی، متابولیسم نشاسته و ساکارز، متابولیسم کربن و متابولیسم گالاکتوز به‌طور معنی‌داری غنی شدند. از سوی دیگر متاژن‌های کاهش بیان یافته علاوه بر مسیرهای متابولیکی، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و مسیر انتقال پیام هورمون‌های گیاهی به مسیرهای بیوسنتز فنیل پروپانوئید، متابولیسم گلیسر فسفولیپید و متابولیسم نیتروژن اختصاص یافتند (شکل ۳).



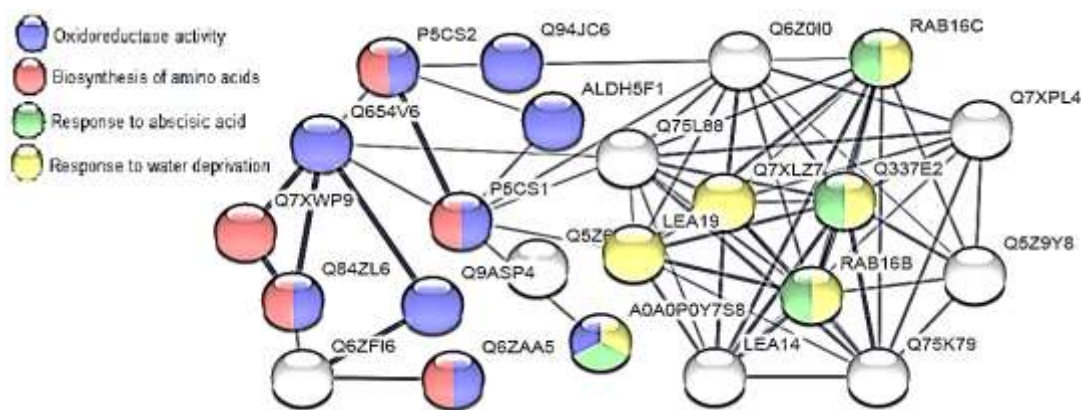
شکل ۳. مسیر KEGG متاژن‌های کاهش (a) و افزایش بیان یافته (b)

Figure 3. KEGG pathway of the down-regulated (a) and up-regulated (b) Meta-genes

برهم کنش پروتئین-پروتئین متاژن‌ها: شبکه برهم‌کنش پروتئین-پروتئین برای ۱۴۱۱ متاژنی که در تمام مطالعات مشترک بود از طریق پایگاه داده STRING با در نظر گرفتن حداقل امتیاز $(0.7) \geq \text{confidence score}$ رسم و مورد بررسی قرار گرفت، سپس ۲۵ ژن کلیدی (hub) که دارای بیشترین امتیاز بودند با استفاده از پلاگین Cyto-Hubba بر اساس روش MCC (Maximal Clique Centrality) انتخاب شدند (جدول ۱).

بررسی عملکردی ژن‌های هاب نشان داد که از میان این ۲۵ ژن، شش ژن در پاسخ به کم آبی نقش داشته‌اند و چهار مورد از آن‌ها مشترکاً در ارتباط با پاسخ به ABA بودند. علاوه بر این، نه مورد از ژن‌های شناسایی شده دارای فعالیت اکسیدوردوکتاز بوده

و در فرایندهای اکسیداسیون و احیا نقش دارند. این امر می‌تواند حاکی از افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی در گیاه برنج در راستای کاهش آسیب‌های ناشی از خشکی باشد، همان‌طور که در مطالعات پیشین نیز بر نقش فعالیت اکسیدوردوکنازی در تحمل به خشکی در برنج تأکید شده است (Huang et al. 2014). یکی از مسیرهای مهم شناسایی شده با پنج ژن از ژن‌های کلیدی، مسیر بیوستنز اسیدهای آمینه بود که این امر نیز نشان دهنده اهمیت ژن‌های درگیر در این مسیرها هستند (شکل ۴).



شکل ۴. شبکه برهم‌کنش پروتئین-پروتئین ژن‌های کلیدی

Figure 4. Protein-protein interaction network of hub genes

پروتئین‌ها و مسیرهای مهم شناسایی شده در پاسخ به تنش خشکی- پروتئین‌های عملکردی مهم در

پاسخ به تنش: مجموعه‌ای از ژن‌های هسته‌ای پاسخ‌دهنده به خشکی که بیان متفاوتی داشتند، در این مطالعه شناسایی شد. گروه اصلی ژن‌های کلیدی که افزایش بیان یافته بودند، شامل ژن‌های کدکننده پروتئین‌های LEA (۱۱ ژن) و دهیدرین‌ها (متعلق به گروه II پروتئین‌های LEA) (چهار ژن) با بیان بیش از پنج برابر بود. این پروتئین‌ها در بسیاری از گونه‌های گیاهی در پاسخ به کمبود آب در گیاه تجمع می‌یابند و همبستگی بالایی با کسب تحمل به خشکی دارند. با توجه به نتایج آنالیز شبکه، این گروه از پروتئین‌ها جزء ۲۵ ژن کلیدی بودند که این امر می‌تواند نقش مهم آن‌ها را به اثبات برساند. نتایج همچنین نشان‌دهنده افزایش بیان چپرون‌هایی از خانواده پروتئین‌های شوک حرارتی HSP90، HSP70 و پروتئین‌های Dna J بود که مسئول تاخوردگی، مونتاژ، انتقال و تخریب پروتئین در طیف وسیعی از فرآیندهای سلولی هستند. علاوه بر آن‌ها، فاکتور شوک حرارتی (HSF) نیز که به‌طور خاص به عارضه شوک حرارتی در ناحیه پروموتور ژن‌های HSP متصل و در تنظیم رونویسی آن‌ها ایفای نقش می‌کند، با افزایش بیان همراه بود (Liu et al. 2020). HSP و HSF‌ها به‌عنوان فعال‌کننده یا سرکوب‌کننده نقش کلیدی در حفاظت از سلول‌ها یا بافت‌های گیاهی در برابر تنش‌های غیرزیستی مختلف دارند (Benny et al. 2019). از جمله ژن‌های دیگری که دارای تغییرات بیانی معنی‌داری در این پژوهش بودند، می‌توان به ABC ترنسپوزرها، ژن اکسپن‌سین و ژن‌های آکوپورین اشاره

کرد که حاکی از نقش مهم این ژن‌ها در پاسخ به خشکی است. به‌عنوان مثال آکوپورین‌ها که مسئول تنظیم دقیق حرکت آب هستند، ممکن است نقش مهمی در پاسخ به تنش خشکی و همچنین در تحمل به تنش خشکی ایفا کنند. بیان ژن آکوپورین *TIP* که در انتقال آب نقش دارند، در مطالعه حاضر کاهش یافته است. الگوی بیان مشابهی برای این ژن تحت تنش خشکی در گیاه جو گزارش شده است. کاهش بیان ژن آکوپورین *TIP* می‌تواند منجر به کاهش نفوذپذیری غشا به آب شود و سبب جلوگیری از اتلاف آب و به حداقل رساندن جریان آب از طریق غشاهای سلولی به‌منظور حفظ تورگر برگ شود (Kurowska et al. 2019).

جدول ۱. لیست ۲۵ ژن کلیدی شناسایی شده در پاسخ به تنش خشکی در برنج

Table 1. List of 25 hub genes identified in response to drought stress in rice

شناسه ژن gene ID	تغییرات بیان log2FC	adj.pvalue	توضیحات ژن‌ها Genes description
Os05g0455500	3.121649635	0	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase
Os01g0848200	3.715567966	0	delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase-like
Os02g0173900	2.014254845	0	Succinate-semialdehyde dehydrogenase
Os08g0154300	1.333237424	0	transaldolase
Os08g0502700	-1.538761756	0	serine-glyoxylate aminotransferase
Os01g0328700	-1.101474111	0	dihydrolipoyl dehydrogenase 1, mitochondrial
Os01g0591300	1.619947958	0	aldehyde dehydrogenase family 2
Os08g0447000	-1.606836512	0	Similar to D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
Os04g0266900	3.684112517	0	transketolase, chloroplastic
Os10g0505900	6.972320352	0	low-temperature-induced 65 kDa protein
Os01g0705200	5.727741980	0	Late embryogenesis abundant protein group 3
Os11g0454200	9.302221246	0	dehydrin Rab16B
Os05g0373900	6.450151021	0	Similar to eRF1
Os03g0168100	7.424637968	0	Late embryogenesis abundant protein group 3
Os05g0122700	6.510458327	0	Low-temperature induced protein Lt101.2
Os11g0454000	4.113372643	0	Dehydrin RAB 16C
Os04g0610600	7.896444285	0	ABA-inducible protein PHV A1
Os04g0589800	5.837890359	0	Late embryogenesis abundant group 1
Os03g0305600	5.988368015	0	outer envelope pore protein
Os05g0542500	7.930356506	0	Late embryogenesis abundant protein, group 3
Os12g0178000	2.409179488	0	Belongs to the aldehyde dehydrogenase family
Os06g0698300	4.537686077	0	Protein phosphatase 2C family protein
Os06g0341300	6.102173099	0	late embryogenesis abundant protein D-34
Os06g0246500	6.017316700	0	Similar to Pyruvate dehydrogenaseE1 α -subunit
Os08g0327700	5.751328281	0	11 kDa late embryogenesis abundant protein

مسیر انتقال پیام هورمونی: هورمون‌های گیاهی انواع مختلفی از ترکیبات درون‌زا هستند و نقش حیاتی در رشد و نمو

گیاه از جمله مقاومت به خشکی دارند. ABA یکی از فیتوهورمون‌هایی است که بسیار مورد مطالعه قرار گرفته و به‌عنوان

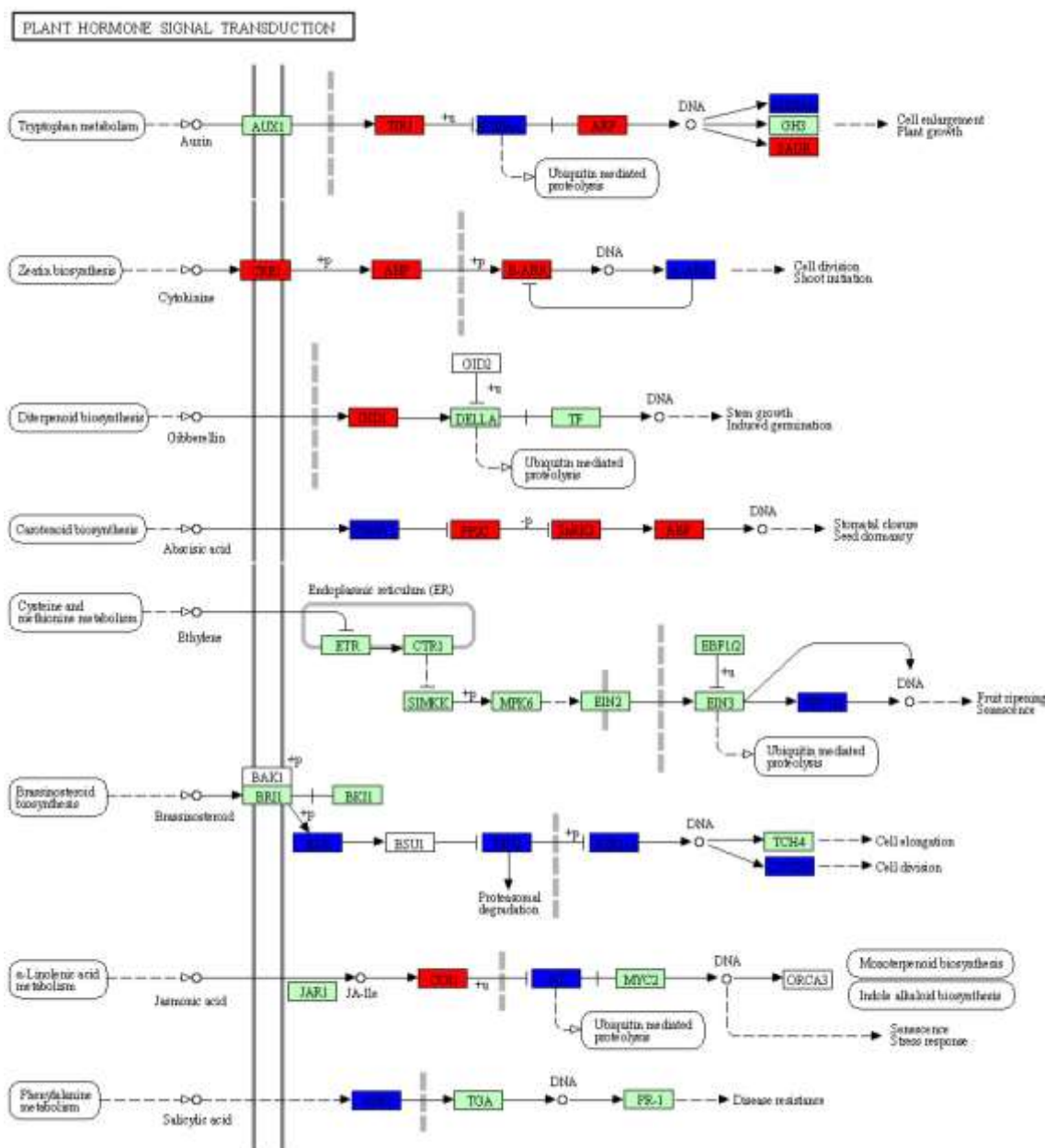
اصلی‌ترین هورمون پاسخ دهنده به تنش، نقش آن به خوبی شناخته شده است (Tuteja 2007). گیاهان در پاسخ به شرایط نامطلوب محیطی سطح ABA را در خود تنظیم می‌کنند. تجمع ABA سلولی تحت تنش سبب فعال شدن ژن‌های پاسخ دهنده به ABA و بسته شدن روزنه‌ها به منظور کاهش از دست رفتن آب در طی تنش می‌شود (Shaar-Moshe et al. 2015). در مطالعه حاضر نیز سطح بیان ژن‌های کلیدی درگیر در بيو سنتز و انتقال سیگنال ABA به‌طور قابل توجهی تغییر یافته است. از ژن‌های درگیر در بیوسنتز ABA که در این مطالعه شناسایی شد می‌توان به *NCED1* و *NCED3* (*cis-9*) *epoxycarotenoid dioxygenase* اشاره کرد که بیان آن‌ها در طی تنش افزایش یافته بود. بیان ژن *NCED3* به‌عنوان یکی از ژن‌های کلیدی در متابولیسم ABA تحت تنش خشکی در گونه‌های مختلف از جمله آرابیدوپسیس افزایش یافته است و سطح ABA درونی را نیز تحت شرایط تنش کنترل می‌کند (Iuchi et al. 2001). در مجموع ۵۲ متاژنی که در مسیر انتقال هورمون شناسایی شدند، ۱۶ ژن نیز مرتبط با مسیر انتقال سیگنال ABA بودند از جمله سه ژن *PYL* که بیان آن‌ها کاهش و هفت ژن *PP2C*، چهار ژن *SnRK2* و دو ژن *ABF* که تحت تنش افزایش بیان داشته‌اند (شکل ۵). مطالعات پیشین در گیاه آرابیدوپسیس نیز نشان داده است که تحت تیمار ABA و شرایط تنش خشکی، سطح بیان *PP2C*، *ABF* و *SnRK2* افزایش و *PYL/PYR* کاهش می‌یابد (Chan 2012). به‌طور کلی می‌توان گفت تنظیم مثبت ژن‌های دخیل در بیوسنتز ABA در پاسخ به تنش احتمالاً می‌تواند نشان‌دهنده افزایش سطح ABA درون‌زا در برنج به‌منظور افزایش سازگاری با تنش خشکی باشد. اکسین یکی دیگر از فیتوهورمون‌های مهم است که در تنظیم رشد، نمو و سازگاری گیاه در شرایط متغیر محیطی نقش حیاتی ایفا می‌کند. نتایج این مطالعه حاکی از تنظیم ژن‌های مهم درگیر در مسیر انتقال پیام اکسین (*ARF*، *SAUR*، *TIRI* و *Aux/IAA*) با افزایش بیان *SAUR*، *TIRI* و *ARF* و کاهش بیان *Aux/IAA* است (شکل ۵). *SAUR*ها ژن‌های اولیه پاسخ دهنده به اکسین هستند که به شدت در مسیر سیگنال‌دهی اکسین نقش دارند و به سرعت توسط تیمار با اکسین القا می‌شوند و فرآیندهای رشدی و فیزیولوژیکی مختلفی را در گیاهان تنظیم می‌کنند. گزارش شده است که *AtSAUR36* گسترش سلولی را به‌طور منفی تنظیم و رشد برگ را مهار می‌کند (Hou et al. 2013). مطالعه بر روی *AtSAUR32* نیز نشان‌دهنده ایفای نقش این ژن در تحمل خشکی از طریق انتقال سیگنال ABA است. این یافته‌ها حاکی از این است که پروتئین‌های *SAUR* در زیرخانواده‌های مختلف، ممکن است به شیوه‌ای مشابه عمل کنند و رشد گیاه را از جنبه‌های مختلف تحت تأثیر قرار دهند (He et al. 2021). یافته‌های پیشین نشان دهنده افزایش بیان ژن *TIRI* تحت تنش خشکی و اسمرزی و نقش مهم آن بوده است (Kilian et al. 2007). تنظیم مثبت *ARF*ها و کاهش بیان ژن‌های *Aux/IAA* سبب افزایش حساسیت نسبت به اکسین می‌شود که علاوه بر افزایش غلظت IAA آزاد، بیانگر افزایش ژن‌های پاسخ دهنده به اکسین می‌شود. به‌نظر می‌رسد که میان پاسخ به تنش اسمرزی و اکسین در بافت برگ اثر متقابل وجود دارد و افزایش متوسط غلظت اکسین باعث تحریک رشد برگ می‌شود، این در حالی است که غلظت‌های بیش از مقادیر بهینه می‌تواند اثر بازدارندگی نیز داشته باشد. علاوه بر این، همپوشانی فراوانی میان اکسین و ژن‌های

ناشی از تنش اسمزی در برگ‌های در حال تکثیر مشاهده شده، به‌عبارتی در این بافت‌ها تنش اسمزی تنظیم رونویسی وابسته به اکسین را تحریک می‌کند. این بدان معناست که برگ‌ها در شرایط اسمزی رفتاری مشابه با برگ‌هایی که تحت غلظت‌های فوق بهینه اکسین رشد می‌کنند، دارند (Kalve et al. 2020).

در این مطالعه کاهش بیان تعدادی از ژن‌های درگیر در مسیر انتقال پیام برا سینواستروئید (BR) تحت تنش خشکی مشاهده شد. مطالعات متعدد بر روی نقش BR نشان داده‌اند که تیمار BR خارجی می‌تواند تحمل گیاهان به خشکی را افزایش دهد. از سوی دیگر مطالعاتی که بر روی جهش یافته‌های فاقد BR انجام شده حاکی از افزایش تحمل به خشکی است که این امر نشان‌دهنده اثر بازدارندگی مسیر BR بر تحمل به خشکی است (Krishna 2003; Feng et al. 2015; Ye et al. 2017). BR یک فیتوهورمون محرک رشد است که رشد گیاه را در ارتباط با سایر هورمون‌های گیاهی و عوامل محیطی تنظیم می‌کند. در حضور BR، گیرنده (BR1 insensitive 1) BR1 و گیرنده BAK1 (BR1-associated kinase) یک آبشار فسفوریلاسیون را آغاز می‌کند که سبب مهار BIN2 (brassinosteroid insensitive 2) می‌شود. BIN2 به عنوان یک تنظیم کننده منفی در سیگنال دهی BR با فسفریله کردن فاکتورهای رونویسی BZR1 (brassinazole-resistant 1) و BZR2 عمل می‌کند (Li et al. 2020). جهش یافته ناک اوت *OsGSK1*، ارتولوگ *AtBIN2* در برنج سبب افزایش تحمل به سرما، گرما، شوری و تنش خشکی شده است (Koh et al. 2007).

مطالعات در گندم نشان داده که جا سمونیک اسید (JA) تو سط تنش آبی القا می‌شود و تیمار گیاهان با JA نیز توانایی‌های آنتی اکسیدانی گیاهان را تحت تنش آبی افزایش می‌دهد. سیگنال دهی JA تو سط ژن *CO11* (*coronatine insensitive1*) شناسایی و سبب تخریب پروتئین‌های JAZ شده است که به‌عنوان سرکوب کننده فاکتورهای رونویسی مانند تنظیم کننده اصلی MYC2 عمل می‌کنند. بنابراین تنش خشکی نیز ممکن است با القای بیان *CO11* در سیگنال دهی JA شرکت کند (Li et al. 2017). این امر می‌تواند نشان‌دهنده نقش مهم انتقال پیام JA در پاسخ به خشکی باشد.

متابولیسم اسید آمینه: آنالیز مسیر متاژن‌ها نشان داده است که بسیاری از ژن‌های دخیل در متابولیسم اسید آمینه تحت تنش خشکی تغییر بیان داشته‌اند. از جمله ژن‌های دلتا (۱)-پیرولین-۵-کربوکسیلات سنتاز (*P5CS*)، پرولین اکسیداز (*PROX*)، آسپاراژین سنتاز (*ASNS*)، آروگنات دهیدروژناز (*ADH*)، تیروزین آمینوترانسفراز (*TAT*)، گلوتامین سنتتاز (*GS*)، گلوتامات دکربوکسیلاز (*GAD*) و گلوتامات سنتاز. پرولین یکی از مهم‌ترین اسیدهای آمینه‌ای است که تحت تنش در گیاه انباشته می‌شود و به‌عنوان یک اسمولیت سازگار و پاک کننده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند. پرولین از طریق یک سلسله فرایند از طریق ۷-گلوتامیل کیناز (*γ-GK*)، پیرولین-۵-کربوکسیلات سنتتاز (*P5CS*)، پیرولین-۵-کربوکسیلات (*P5C*) و *P5C* ردوکتاز (*P5CR*) از گلوتامات بیوستتوز یا از طریق یک مسیر جایگزین به‌وسیله‌ی اورنیتین-دلتا آمینوترانسفراز (*Δ-OAT*) از اورنیتین، سنتز می‌شود.



شکل ۵. متاژن‌های دخیل در انتقال سیگنال هورمون‌های گیاهی. ژن‌هایی که به‌طور معنی‌داری افزایش و یا کاهش بیان یافته‌اند به ترتیب با رنگ‌های آبی و قرمز مشخص شده‌اند

Figure 5. Meta-genes involved in plant hormones signal transduction. Genes significantly up and down regulated are highlighted in blue and red color, respectively

گزارش‌های پیشین در سایر گیاهان نیز حاکی از القای بیان *P5CS* و *Δ-OAT* در طی تنش خشکی است (Ahanger et al. 2014). در مطالعه حاضر ۳ ژن *P5CS* و *Δ-OAT* با افزایش بیان قابل توجهی ($\log_2FC \geq 2$) شناسایی شد و این درحالی

است که ژن پرولین اکسیداز (*PROX*) که یکی از آنزیم‌های مهم در کنترل سطح پرولین است، کاهش بیان داشته است. افزایش فعالیت γ -*GK* و کاهش فعالیت *PROX* در *Catharanthus roseus* و *Morus alba* نیز گزارش شده است (Jaleel et al. 2010; Ahmad et al. 2007). تجمع پرولین یک فرآیند بسیار تنظیم شده است که شامل مجموعه‌ای از پروتئین کینازها است که در تحمل تنش‌ها از جمله خشکی نقش بسیار مهمی ایفا می‌کنند. این پروتئین‌ها شامل پروتئین کیناز SNF1 (*SnRK2*)ها است که القای بیان آن‌ها در این مطالعه نیز همچون نتایج مطالعات پیشین در سایر گیاهان، مشاهده شد. *SnRK3*ها خانواده دیگری از پروتئین کینازهای SNF است که سطح پرولین را طی تنش افزایش می‌دهند. *SnRK3* پروتئین‌های متصل شونده به پروتئین شبه کلسینورین B (*CBL*) هستند که به‌عنوان پروتئین کینازهای برهم‌کنش‌کننده با *CBL* (*CIPK*) نیز شناخته می‌شوند. در مطالعه حاضر نیز ۶ ژن *CIPK* که بیانشان افزایش یافته بود، شناسایی شد. بیش بیان *OsCIPK03* و *OsCIPK12* منجر به افزایش تحمل برنج به سرما و خشکی از طریق افزایش قابل توجه پرولین شده است (Ahanger et al. 2014).

مسیر متابولیسم گالاکتوز، نشا سته و ساکارز: نشا سته یک مولکول کلیدی در میانجی‌گری واکنش‌های گیاه به تنش‌های غیرزیستی از جمله خشکی است. تحت چنین شرایط نامساعد محیطی، گیاهان عموماً نشا سته را برای تأمین انرژی و کربن در مواقعی که فتوسنتز با محدودیت مواجه شده است، مجدداً انتقال می‌دهند. وجود ساکارز کافی نیز می‌تواند یک منبع انرژی مهم برای سلول‌ها باشد و از سوی دیگر می‌تواند به‌عنوان یک محافظ اسمزی و املاح سازگار در کاهش اثر منفی تنش و محافظت از غشاهای زیستی و پروتئین‌ها در برابر تنش‌های غیرزیستی عمل کند. قندها همچنین می‌توانند به‌عنوان مولکول‌های سیگنال‌دهنده با مسیر سیگنال‌دهی وابسته به ABA برای فعال کردن اجزای پایین‌دستی در آبشار پاسخ به تنش به صورت متقابل عمل کنند (Thalman & Santelia 2017). در میان متاژن‌ها، ۲۸ ژن در ارتباط با مسیر متابولیسم نشا سته و ساکارز شناسایی شد که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به ADP-گلوکز پیروفسفوریلاز (*AGPase*) با کاهش بیان α و β آمیلاز (*AMY* و *BAM*) با افزایش بیان، اشاره کرد. تنش آبی می‌تواند فعالیت ژن‌های مربوط به تجزیه نشا سته β -آمیلاز و α -آمیلاز را در گیاه جو و خیار القا کند (Todaka et al. 2000; Jacobsen et al. 1986). نشان داده شده است که افزایش انتقال مجدد نشا سته در ساقه‌ها تحت تنش آبی با افزایش فعالیت α -آمیلاز و β -آمیلاز ارتباط نزدیکی دارد. البته این در حالی است که فعالیت β -آمیلاز در مقایسه با α -آمیلاز، تحت تنش آبی به میزان کمتری افزایش یافته و با انتقال مجدد، همبستگی کمتری داشته است. همبستگی بالای فعالیت α -آمیلاز با قندهای محلول و انتقال مجدد نشا سته به هیدرولیز سریع نشا سته که عمدتاً به دلیل افزایش فعالیت α -آمیلاز تحت تنش آبی است، نسبت داده می‌شود. α -آمیلاز ممکن است یک آنزیم تنظیم‌کننده تجزیه نشا سته باشد زیرا این آنزیم، بر خلاف β -آمیلاز، می‌تواند به گرانول‌های نشا سته دست نخورده حمله کرده و آن‌ها را تجزیه کند. این در حالی است که تصور می‌شود β -آمیلاز تنها عمل هیدرولیز را انجام می‌دهد. بنابراین در طول تنش خشکی، نشا سته به جای سنتز عمدتاً تخریب می‌شود (Yang et al. 2001). از سایر ژن‌های شناسایی شده در پژوهش حاضر که مرتبط با مسیر متابولیسم نشا سته و ساکارز بودند،

ژن‌های کدکننده آنزیم‌های مسئول هیدرولیز و سنتز ساکارز (ساکارز فسفات سنتاز (*SPS*) و ساکارز سنتاز (*SUS*)) بود که بیان آن‌ها تحت تنش خشکی افزایش یافت. گزارش‌های پیشین نیز افزایش قابل توجه *SPS* و *SUS* در سطوح mRNA در برگ‌های گیاه گندم تحت تنش خشکی را نشان داده‌اند. افزایش بیان ژن‌های *SPS* در برگ‌های تحت تنش خشکی می‌تواند به‌عنوان مکانیزمی برای افزایش تجمع قندهای محلول ناشی از خشکی در نظر گرفته شود. نقش آنزیم *SUS* نیز عمدتاً در تبدیل ساکارز به UDP-گلوکز و فروکتوز در نظر گرفته شده است. بنابراین، افزایش سطح رونوشت‌های *SUS* می‌تواند به تجمع فروکتوز برگ در طول تنش خشکی کمک کند (Xue et al. 2008). گزارش شده است که ژن‌های متابولیسم گالاکتوز، فروکتوز و مانوز در کنبند متحمل به خشکی به منظور مقابله با تنش افزایش بیان می‌یابد. قندهایی مانند گابا، گالاکتوز، فروکتوز و مانوز به‌عنوان پیش‌سازهای متابولیکی در بسیاری از فرآیندهای زیستی گیاهان عمل می‌کنند. علاوه بر این متابولیسم ساکارز و نشاسته و گالاکتوز در گیاهان مختلف تحت تنش خشکی القا می‌شوند (Gundaraniya et al. 2020). تغییر بیان ژن‌های درگیر در مسیرها می‌تواند نشان‌دهنده تنظیم متابولیسم قند و انرژی برای سازگار شدن گیاه برنج با تنش خشکی باشد.

متابولیسم لیپید: نتایج نشان داد که بیان ژن‌های دخیل در متابولیسم لیپید نیز تحت تنش خشکی تنظیم می‌شود. یکی از ژن‌های مهم در مسیر تخریب لیپید، آلدئید دهیدروژنازها (*ALDH*) است که در این پژوهش بیان آن (Os02g0173900) در طی تنش به طور قابل توجهی افزایش یافته است. آلدئید دهیدروژنازها نقش اصلی در فرآیندهای سم‌زدایی آلدئیدهای تولید شده در گیاهان در مواجهه با تنش‌های غیرزیستی ایفا می‌کنند. به نظر می‌رسد تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی یکی از رویکردهای گیاهان برای کاهش سطح تنش اکسیداتیو می‌باشد. ژن‌های مختلف *ALDH* گیاهی در اثر تنش‌های محیطی از جمله خشکی و شوری فعال می‌شوند، به‌عنوان مثال، بیان دو ژن *ALDH* آرابیدوپسیس و جو به‌منظور بهبود تحمل به تنش تحت شرایط تنش خشکی افزایش می‌یابد. مطالعات پیشین نیز نشان داده است که توتون و آرابیدوپسیس تراریخته‌ای که ژن *ALDH* در آن‌ها بیش بیان شده است، تحمل بالایی در برابر تنش اکسیداتیو داشته‌اند، که این امر با کاهش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن و مالون دی‌آلدئید حاصل از پراکسیداسیون لیپیدی سلولی مرتبط است. علاوه بر این تیمار ABA نیز سبب القا بیان *ALDH7B4* در آرابیدوپسیس گردیده است. بنابراین، به نظر می‌رسد که افزایش بیان *ALDH* حاصل از القا توسط ABA ممکن است تحمل به تنش را از طریق از بین بردن آلدئیدهای سمی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی بهبود بخشد (Gai et al. 2020). نتایج آنالیز شبکه در این مطالعه نیز نشان‌دهنده نقش مهم و کلیدی این ژن و خانواده دهیدروژنازها در پاسخ به خشکی بود. شناسایی ژن‌هایی که در مطالعات پیشین در سایر گیاهان به آن‌ها اشاره شده، نشان‌دهنده اهمیت مسیرهای عملکرد این ژن‌ها در گیاه برنج و اعتبار نتایج حاصل از روش فراتحلیل است.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر به بررسی جامعی از تغییرات رونویسی و فرآیندهای پیچیده پاسخ به تنش خشکی در گیاه برنج با استفاده از تلفیق نتایج RNA-Seq مطالعات مختلف از طریق فراتحلیل پرداخته شد. شناسایی و تعیین نقش عملکردی

DEGها و مسیرهای زیستی درگیر در آنها می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی و یا ایجاد گیاهان تراریخته در راستای افزایش تحمل به تنش، مفید واقع شود. در این مطالعه در میان ۶۶۰۷ متاژن شناسایی شده، علاوه بر شناسایی ژن‌های کلیدی مانند *LEA*، *P5CS*، *HSP dehydrin Rab* و ژن‌های خانواده *ALDH* مرتبط با متابولیسم هورمون و سیگنال‌دهی، بیوسنتز اسیدهای آمینه و متابولیسم کربوهیدرات‌ها، تعداد ۱۶۲ ژن جدید نیز از جمله *OsGIL9*، *NB-ARC*، *RanBP*، *OsFH4* و *STY46* که در فرایندهای مهم سلولی نقش دارند تنها از طریق فراتحلیل شناسایی شد که این امر نشان‌دهنده‌ی کارایی بالای این روش در پژوهش‌های مرتبط با بهبود عملکرد گیاه از طریق شناسایی ژن‌های کلیدی و جدید دخیل در پاسخ به شرایط مورد مطالعه است.

سپاسگزاری: از مرکز محاسبات سریع دانشگاه شهرکرد که ما را در پیشبرد این مطالعه یاری کردند و همچنین از سردبیر و

داوران محترم به‌خاطر مطالعه متن مقاله حاضر و ارائه نظرهای ارزشمند سپاسگزاری می‌شود.

منابع

عرب پور رق آبادی زهرا، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین (۱۴۰۰) الگوی بیانی ژن *p32* در بافت‌های ران، دست، راسته و چربی پشت بره کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۳(۴)، ۱۸۳-۲۰۰.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) بیان ژن *ESRI* در بز کرکی رایینی با استفاده از real time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۱)، ۱۷۷-۱۹۲.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن *ESR2* در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۱۸۴-۱۶۹.

محمدآبادی محمدرضا، سفلی محمد (۱۳۹۹). پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن *BMP15* در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۳)، ۲۰۸-۱۹۱.

محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از real time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۳)، ۱۲۲-۱۱۱.

References

- Ahanger MA, Tyagi SR, Wani MR, Ahmad P (2014) Drought tolerance: role of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. In *Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment*. Springer, New York, NY. pp. 25-55.
- Ahmad P, Jaleel CA, Sharma S (2010) Antioxidant defense system, lipid peroxidation, proline metabolizing enzymes and biochemical activities in two *Morus alba* genotypes subjected to NaCl stress. *Russ J Plant Physiol* 57(4), 509-517.

- Alimadadi A, Munroe PB, Joe B, Cheng X (2020) Meta-analysis of dilated cardiomyopathy using cardiac RNA-Seq transcriptomic datasets. *Genes* 11(1), 60.
- Andrews S (2017) FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. 2010. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Arabpour Z, Mohammadabadi M, Khezri A (2021) The expression pattern of p32 gene in femur, humeral muscle, back muscle and back fat tissues of Kermani lambs. *Agric Biotechnol J* 13 (4), 183-200 (In Persian).
- Ashrafi-Dehkordi E, Alemzadeh A, Tanaka N, Razi H (2018) Meta-analysis of transcriptomic responses to biotic and abiotic stress in tomato. *Peer J* 6, e4631.
- Benny J, Pisciotta A, Caruso T, Martinelli F (2019) Identification of key genes and its chromosome regions linked to drought responses in leaves across different crops through meta-analysis of RNA-Seq data. *BMC plant* 19(1), 1-18.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinform* 30, 2114-2120.
- Chan Z (2012) Expression profiling of ABA pathway transcripts indicates crosstalk between abiotic and biotic stress responses in Arabidopsis. *Genomics* 100(2), 110-115.
- Chen N, Xu Y, Wang X et al. (2011) *OsRAN2*, essential for mitosis, enhances cold tolerance in rice by promoting export of intranuclear tubulin and maintaining cell division under cold stress. *Plant Cell Environ* 34(1), 52-64.
- Choudhury S, Muthusamy SK, Padaria JC, Dalal M (2021) Genome-wide identification of Ran GTPase family genes from wheat (*T. aestivum*) and their expression profile during developmental stages and abiotic stress conditions. *Funct Integr Genom* 21(2), 239-250.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F et al. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinform* 29(1), 15-21.
- Duan WJ, Liu ZH, Bai JF et al. (2021) Comprehensive analysis of formin gene family highlights candidate genes related to pollen cytoskeleton and male fertility in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC genom* 22(1), 1-16.
- Ereful NC, Liu LY, Greenland A et al. (2020) RNA-seq reveals differentially expressed genes between two indica inbred rice genotypes associated with drought-yield QTLs. *Agron* 10(5), 621.
- Feng Y, Yin Y, Fei S (2015) Down-regulation of *BdBR11*, a putative brassinosteroid receptor gene produces a dwarf phenotype with enhanced drought tolerance in *Brachypodium distachyon*. *Plant Sci* 234, 163-173 .

- Gai Z, Wang YU, Ding Y et al. (2020). Exogenous abscisic acid induces the lipid and flavonoid metabolism of tea plants under drought stress. *Sci Rep* 10(1), 1-13.
- Galbiati F, Chiozzotto R, Locatelli F et al. (2016) Hd3a, RFT1 and Ehd1 integrate photoperiodic and drought stress signals to delay the floral transition in rice. *Plant Cell Environ* 39(9), 1982-1993.
- Gundaraniya SA, Ambalam PS, Tomar RS (2020) Metabolomic profiling of drought-tolerant and susceptible peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes in response to drought stress. *ACS omega* 5(48), 31209-31219.
- He Y, Liu Y, Li M et al. (2021) The Arabidopsis SMALL AUXIN UP RNA32 Protein Regulates ABA-Mediated Responses to Drought Stress. *Front Plant Sci* 12:625493 .
- Huang L, Zhang F, Wang W et al. (2014) Comparative transcriptome sequencing of tolerant rice introgression line and its parents in response to drought stress. *BMC genom* 15(1), 1-16.
- Heberle H, Meirelles GV, da Silva FR et al (2015) InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinform* 16, 169.
- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T et al. (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J* 27(4), 325-333.
- Jacobsen JV, Hanson AD, Chandler PC (1986) Water stress enhances expression of an α -amylase gene in barley leaves. *Plant Physiol* 80(2), 350-359.
- Jaleel CA, Gopi R, Sankar B et al. (2007) Studies on Germination, Seedling Vigour, Lipid Peroxidation and Proline Metabolism in *Catharanthus roseus* Seedlings under Salt Stress, *S Afr J Bot* 73(2), 190–195.
- Kalve S, Sizani BL, Markakis MN et al. (2020) Osmotic stress inhibits leaf growth of *Arabidopsis thaliana* by enhancing ARF-mediated auxin responses. *New Phytol* 226(6), 1766-1780.
- Keel BN, Zarek CM, Keele JW et al. (2018) RNA-Seq Meta-analysis identifies genes in skeletal muscle associated with gain and intake across a multi-season study of crossbred beef steers. *BMC genom* 19(1), 1-11.
- Kilian J, Whitehead D, Horak J, et al. (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J* 50(2), 347-363.
- Kim SH, Arnold D, Lloyd A, Roux SJ (2001) Antisense expression of an Arabidopsis ran binding protein renders transgenic roots hypersensitive to auxin and alters auxin-induced root growth and development by arresting mitotic progress. *Plant Cell* 13(12), 2619-2630 .

- Klaas M, Haiminen N, Grant J et al. (2019) Transcriptome characterization and differentially expressed genes under flooding and drought stress in the biomass grasses *Phalaris arundinacea* and *Dactylis glomerata*. *Ann bot* 124(4), 717-730 .
- Koh S, Lee SC, Kim MK, (2007) T-DNA tagged knockout mutation of rice *OsGSK1*, an orthologue of *Arabidopsis BIN2*, with enhanced tolerance to various abiotic stresses. *Plant mol biol* 65(4), 453-466.
- Kong W, Zhong H, Gong Z et al. (2019) Meta-analysis of salt stress transcriptome responses in different rice genotypes at the seedling stage. *Plants* 8(3), 64.
- Krishna P (2003) Brassinosteroid-mediated stress responses. *J Plant Growth Regul* 22(4), 289-297.
- Kurowska MM, Wiecha K, Gajek K, Szarejko I (2019) Drought stress and re-watering affect the abundance of TIP aquaporin transcripts in barley. *PLoS One* 14(12), e0226423.
- Li J, Zhou H, Zhang Y et al. (2020). The GSK3-like kinase BIN2 is a molecular switch between the salt stress response and growth recovery in *Arabidopsis thaliana*. *Dev Cell* 55(3), 367-380.
- Li H, Li M, Wei X et al. (2017) Transcriptome analysis of drought-responsive genes regulated by hydrogen sulfide in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Mol Genet Genom* 292(5), 1091-1110.
- Liu X, Meng P, Yang G et al. (2020) Genome-wide identification and transcript profiles of walnut heat stress transcription factor involved in abiotic stress. *BMC genom* 21(1), 1-13.
- Lv Y, Xu L, Dossa K et al. (2019) Identification of putative drought-responsive genes in rice using gene co-expression analysis. *Bioinformatics* 15(7), 480.
- Masoudzadeh SH, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2020) Effects of diets with different levels of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder on DLK1 gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Kermani lambs. *Small Rumin Res* 193, e106276.
- Mohammadabadi M (2021) Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. *Agric Biotechnol J* 12 (4), 167-181 (In Persian).
- Mohammadabadi M, Masoudzadeh SH, Khezri A, et al. (2021) Fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder increases Delta-Like Non-Canonical Notch Ligand 1 gene expression in testis, liver, and humeral muscle tissues of growing lambs. *Heliyon* 7 (12), e08542.
- Mohammadabadi M, Soflaei M (2020) Tissue-specific mRNA expression profile of *BMP15* gene in goat. *Agric Biotechnol J* 12, 191-208 (In Persian).

- Mohammadabadi MR (2020) Expression of *ESR1* gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 12 (1), 177-192 (In Persian).
- Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of *leptin* gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 10, 111-122 (In Persian).
- Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Characteristics determination of *Rheb* gene and protein in Raini Cashmere goat. *Iran J Appl Anim Sci* 7, 289-295.
- Prabu G, Kawar PG, Pagariya MC, Prasad DT (2011) Identification of water deficit stress upregulated genes in sugarcane. *Plant Mol Biol Rep* 29(2): 291-304.
- Rau A, Marot G, Jaffrézic F (2014) Differential meta-analysis of RNA-seq data from multiple studies. *BMC bioinform* 15(1), 1-10.
- Rest JS, Wilkins O, Yuan W et al. (2016) Meta-analysis and meta-regression of transcriptomic responses to water stress in *Arabidopsis*. *Plant J* 85(4), 548-560.
- Shaar-Moshe L, Hübner S, Peleg Z (2015) Identification of conserved drought-adaptive genes using a cross-species meta-analysis approach. *BMC Plant Biol* 15(1), 1-18.
- Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2021) Correlation between insulin-like growth factor 1 gene expression and fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder consumption in muscle of sheep. *Anim Biotechnol* 33, 1-11.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O et al. (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *J Genome Res* 13(11), 2498–2504.
- Thalman M, Santelia D (2017) Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytol* 214(3), 943-951.
- Tian T, Liu Y, Yan H et al. (2017) agriGO v2. 0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic acids res* 45(W1), W122-W129.
- Todaka D, Matsushima H, Morohashi Y (2000) Water stress enhances β -amylase activity in cucumber cotyledons. *J Exp Bot* 51(345), 739-745.
- Tuteja N (2007) Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant signal behav* 2(3), 135-138.
- Van Ooijen G, Mayr G, Kasiem MMA et al. (2008) Structure–function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins. *J Exp Bot* 59(6), 1383–1397.
- Vergata C, Yousefi S, Buti M et al. (2022) Meta-analysis of transcriptomic responses to cold stress in plants. *Func Plant Biol* (abstract). <https://doi.org/10.1071/FP21230>
- Xue GP, McIntyre CL, Glassop D, Shorter R (2008) Use of expression analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress. *Plant Mol Boil* 67(3), 197-214.

- Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q (2001) Activities of starch hydrolytic enzymes and sucrose-phosphate synthase in the stems of rice subjected to water stress during grain filling. *J Exp Bot* 52(364), 2169-2179.
- Ye H, Liu S, Tang B et al. (2017) RD26 mediates crosstalk between drought and brassinosteroid signalling pathways. *Nat Commun* 8(1), 1-13.
- Yi K, Guo C, Chen D et al. (2005) Cloning and functional characterization of a formin-like protein (*AtFH8*) from Arabidopsis. *Plant physiol* 138(2), 1071-1082.
- Zang A, Xu X, Neill S, Cai W (2010) Overexpression of *OsRAN2* in rice and Arabidopsis renders transgenic plants hypersensitive to salinity and osmotic stress. *J exp bot* 61(3), 777-789.