

## **Identification of key genes effective in tolerance to drought stress in rice through meta-analysis of microarray data**

**Sedigheh Soltanpour** 

Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran, E-mail address: sedigheh.soltanpour@gmail.com

**Alireza Tarinejad** 

\*Corresponding author. Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran, E-mail address: tarinejad@yahoo.com

**Karim Hasanpur** 

Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, E-mail address: karimhasanpur@yahoo.com

**Mohammad Majidi** 

Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran, E-mail address: mmajidi82@yahoo.com

---

### ***Abstract***

#### **Objective**

Environmental stresses such as drought, high temperature, salinity and high CO<sub>2</sub> are a serious threat to sustainable agriculture. Drought stress is one of the most important abiotic stresses in rice, which causes a decrease in crop yield. Several researches have been carried out separately to clarify the molecular mechanism of plant response to drought stress. Therefore, meta-analysis can lead to a better understanding of drought stress tolerance mechanisms by integrating the results of several related studies.

#### **Materials and methods**

In this regard, four series of good quality microarray data of rice under drought stress and normal condition were selected and then analyzed by R software limma packages. For meta-analysis were used of meta-RNAseq package and Fisher's method to combine p-values obtained from individual data analysis. Up and down regulated meta-analysis genes under drought stress were identified. Then, Gene ontology, hub genes and Co-expression network analysis were performed. The results

were evaluated using real-time quantitative PCR test in Hashemi rice as sensitive variety and native rice as tolerant variety to water deficit stress in vitro with PEG treatment.

## Results

The results of present study, 578 up-regulated genes and 660 down-regulated genes were obtained. Gene ontology (GO) analysis showed drought response mechanisms and drawing the protein-protein interaction network revealed that the down regulated hub genes under drought stress is mainly related to photosynthesis process and up regulated hub genes under drought stress mainly related to stress tolerance including *HSP*, *LEAs*, *PP2Cs* genes. Finally, the data obtained from the present meta-analysis were confirmed by real-time quantitative PCR on *peroxidase 47*, *OsDSSR1*, *homeobox-leucine zipper protein* and an unknown gene. These findings significantly improve our understanding of drought stress pathway. Identification of hub genes in this study can be effective to obtain an overview of hub genes that play an important role in response to drought stress in rice.

## Conclusions

Identifying downstream of hub genes can help in the production of drought-tolerant rice through classical breeding methods by pyramiding genes or genome manipulation and increase tolerance to drought stress. The result will lead to sustainable agriculture.

**Keywords:** meta-analysis, microarray, drought stress, hub genes, sustainable agriculture.

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Soltanpour S, Tarinejad AR, Majidi M, Hasanpur K (2023) Identification of key genes effective in tolerance to drought stress in rice through meta-analysis of microarray data. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (3), 251-276.

---

*Agricultural Biotechnology Journal* 15 (3), 251-276. DOI: 10.22103/jab.2023.21020.1458

Received: July 06, 2023.

Received in revised form: August 31, 2023.

Accepted: September 01, 2023.

Published online: September 30, 2023.

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




© the authors

## شناسایی ژن های کلیدی موثر در تحمل به تنش خشکی در برنج از طریق فراتحلیل


### داده های ریزآرایه

 **صدیقه سلطانپور**


گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران، رایانامه: sedigheh.soltanpour@gmail.com

 **علیرضا تاری نژاد**

\*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران، رایانامه: tarinejad@yahoo.com

 **کریم حسنیپور**

دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، رایانامه: karimhasanpur@yahoo.com

 **محمد مجیدی**

استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران، رایانامه: mmajidi82@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۱۵ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۶/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۰

### چکیده

**اهداف:** تنش های محیطی مانند خشکی، افزایش دما، شوری و افزایش CO<sub>2</sub> تهدیدی جدی برای کشاورزی پایدار است. تنش خشکی از مهمترین تنش های غیر زیستی در برنج است که باعث کاهش عملکرد محصول می شود. تحقیقات متعددی به صورت جداگانه برای شناسایی سازوکار مولکولی پاسخ گیاه به تنش خشکی انجام شده است. بنابراین فراتحلیل می تواند با ادغام نتایج مطالعات متعدد مرتبط، منجر به درک بهتر سازوکارهای تحمل به تنش خشکی شود.

**مواد و روش ها:** در این راستا، چهار سری داده ریزآرایه با کیفیت مناسب برنج تحت تنش خشکی و شرایط طبیعی انتخاب شد و سپس توسط بسته limma نرم افزار R آنالیز شد. جهت فراتحلیل از بسته meta RNAseq و روش Fisher برای یکی کردن p-value های حاصل از تجزیه انفرادی داده های مورد بررسی استفاده شد. ژن های متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای افزایش و کاهش بیان تحت تنش خشکی شناسایی شد. سپس هستی شناسی ژن (ژن آنتولوژی)، شناسایی ژن های مرکزی یا هاب و آنالیز

شبکه هم بیانی انجام شد. نتایج حاصل با آزمایش real-time quantitative PCR در رقم برنج هاشمی حساس و رقم بومی متحمل به تنش کمبود آب در شرایط درون شیشه‌ای با تیمار PEG ارزیابی گردید.

**نتایج:** از نتایج مطالعه حاضر ۵۷۸ ژن با افزایش بیان و ۶۶۰ ژن با کاهش بیان بدست آمد. تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن (GO) سازوکارهای پاسخ به خشکی را نشان داد و ترسیم شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین مشخص کرد که ژن‌های مرکزی متفاوت بیان شونده دارای کاهش بیان تحت تنش خشکی حاصل از این مطالعه عمدتاً مربوط به فرایند فتوسنتز و ژن‌های مرکزی متفاوت بیان شونده دارای افزایش بیان تحت تنش خشکی عمدتاً مربوط به تحمل تنش شامل ژن‌های *HSP*، *LEAs*، *PP2Cs* هستند. در نهایت، داده‌های به دست آمده از این فراتحلیل با real-time quantitative PCR بر روی ژن‌های پراکسیداز *OsDSSRI*، *homeobox-leucine zipper protein* و یک ژن ناشناخته تایید شد. این یافته‌ها به طور قابل توجهی درک ما را از مسیر تنش خشکی بهبود می‌دهد. شناسایی ژن‌های مرکزی در این مطالعه می‌تواند برای به دست آوردن یک نمای کلی از ژن‌های مرکزی که نقش مهمی در پاسخ به تنش خشکی در برنج دارند، موثر باشد.

**نتیجه‌گیری:** شناسایی ژن‌های پایین دست ژن مرکزی می‌تواند در تهیه برنج متحمل به تنش خشکی از طریق روش‌های اصلاحی کلاسیک با هرمی‌سازی این ژن‌ها یا از طریق دستکاری ژنوم کمک نماید و تحمل به تنش خشکی را افزایش دهد و در نتیجه منجر به کشاورزی پایدار شود.

**واژه‌های کلیدی:** فراتحلیل، ریزآرایه، تنش خشکی، ژن‌های هاب یا مرکزی، کشاورزی پایدار.

**نوع مقاله:** پژوهشی

**استناد:** سلطان‌پور صدیقه، تارینژاد علیرضا، مجیدی محمد، حسن‌پور کریم (۱۴۰۲) شناسایی ژن‌های کلیدی موثر در تحمل به

تنش خشکی در برنج از طریق فراتحلیل داده‌های ریزآرایه. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۳)، ۲۷۶-۲۵۱.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant

Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian

Biotechnology Society.

© the authors



## مقدمه

نیاز به امنیت غذایی برای جمعیت به سرعت در حال رشد جهان در کنار تغییرات اقلیمی و نیز نیاز به استفاده از زمین‌هایی که اغلب در محیط‌های نامساعد قرار دارند، تقاضای بهبود و افزایش عملکرد محصول را بالا می‌برد (Ransbotyn et al. 2015). تنش‌های زیستی و غیرزیستی یکی از علل اصلی رشد ضعیف گیاهان و کاهش تولید محصول در سطح جهانی است. در اکثر گونه‌های

گیاهی به علت تنش غیرزیستی، کاهش رشد بیشتر از ۵۰ درصد مشاهده شده است. این در حالی است که در مزارع کشاورزی، گیاهان باید به طور همزمان بیش از یک تنش را تجربه کنند و سعی کنند به تغییرات آب و هوایی سازگار شوند (Sharma et al. 2018). برنج *Oryza sativa* L. یکی از مهمترین محصولات کشاورزی است که به عنوان یک گونه مدل ایده‌آل برای مطالعات ژنومی محصولات کشاورزی به دلیل ارزش تجاری آن، اندازه ژنوم نسبتاً کوچک (تقریباً ۴۳۰ مگابایت باز)، منشاء دیپلوئید ( $2n=2X=24$ ) و رابطه نزدیک با سایر غلات مهم، ظهور یافته است (Rabbani et al. 2003). برنج دو تا سه برابر بیشتر از سایر محصولات غذایی مانند گندم یا ذرت آب مصرف می‌کند و از ۳۰ درصد آب شیرین مورد استفاده برای محصولات در سراسر جهان استفاده می‌کند. برنج همچنین منبع اصلی غذا برای بیش از نیمی از جمعیت جهان است، به ویژه در کشورهای در حال توسعه در آسیا که کمبود آب و خشکسالی تهدیدی قریب‌الوقوع برای امنیت غذایی است. بنابراین، استفاده پایدارتر از منابع آب جهانی در تولید محصولات زراعی ضروری است (Karaba et al. 2007). عملکرد برنج مانند سایر محصولات کشاورزی به شدت تحت تأثیر تنش‌های غیرزیستی از قبیل تنش شوری و خشکی است. رشد برنج به طور متفاوتی تحت تأثیر تنش خشکی در هر مرحله رشد قرار می‌گیرد (Kim et al. 2007).

عوامل تنش‌زای محیطی مانند خشکسالی، افزایش دما، شوری و افزایش  $CO_2$  بر رشد گیاهان تأثیر می‌گذارد و تهدیدی در حال افزایش برای کشاورزی پایدار است (Ahuja et al. 2010). گیاهان به عنوان موجودات زنده بی‌حکمت، نمی‌توانند به طور فیزیکی از تنش‌های محیطی که می‌توانند رشد آن‌ها را تهدید نمایند، فرار کنند. بنابراین گیاهان مجبور هستند رویکردهایی را برای مقابله با تنش غیرزیستی ایجاد نمایند. در واقع، قابلیت پاسخ‌دهی و در نهایت سازگاری با تنش غیر زیستی ممکن است یک عامل مهم در تکامل باشد (Grennan 2006). برای غلبه بر این محدودیت‌ها و بهبود عملکرد محصول در شرایط تنش، ضروری است که تحمل به تنش در محصولات کشاورزی بهبود یابد. پاسخ گیاهان به تنش‌ها، موضوع مهمی از مطالعات فیزیولوژیکی و مولکولی بوده است. شناسایی ژن‌های جدید، تعیین الگوهای بیان آنها در پاسخ به تنش‌ها و بهبود درک کارکردشان در سازگاری به تنش، پیش‌زمینه‌ای برای رویکردهای موثر در مهندسی برای بهبود تحمل به تنش‌ها فراهم می‌کند (Rabbani et al. 2003). به علاوه، مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده در اواخر دهه ۸۰ میلادی روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi 2020; Safaei et al. 2022). ماده ژنتیکی<sup>۱</sup> یک سلول از تعداد زیادی ژن تشکیل شده است که هیچ‌گاه همه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در هر لحظه فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Arabpour et al. 2021; Mohammadabadi et al. 2021). محیطی که موجود در آن رشد می‌کند مشخص می‌کند که آیا ژن بیان شود و یا این که نیازی به فرآورده آن نیست و باید غیرفعال و یا خاموش شود. ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *E. coli* کشف شد (Mohammadabadi et al. 2018; Masoudzadeh et al. 2020). ژن‌های یوکاریوتی بیان‌شان تحت کنترل موقت و چندبعدی است. در هر یک از انواع بافت‌ها تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد. بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است. 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).

<sup>۱</sup>. DNA

یکی از اقدامات اساسی در بهنژادی ملکولی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات مهم و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadabadi and Soflaei 2020; Shahsavari et al. 2022). مطالعات ترانسکریپتوم ریزآرایه مختلفی در برنج تحت شرایط تنش‌های گوناگون غیر زیستی انجام شده است اما آنها فقط تعداد خاصی از خانواده ژنی خاص را در پاسخ به تنش‌های مختلف گزارش کرده‌اند که شامل خانواده عوامل رونویسی MADS-box، پروتئین‌های F-Box، خانواده ژنی Calcium- Dependent Protein Kinase (CDPK)، ژن‌های پاسخ به اکسین، خانواده ژنی سولفوترانسفراز (SOT)، خانواده ژنی تیردوکسین، Half-Size ABC Protein sub group G، خانواده ژنی آمینوترانسفراز Class III، خانواده ژنی  $Ca^{2+}$  ATP ases، خانواده RINGE3 Ligase برنج می‌باشد (Jangam et al. 2016). مطالعات دیگر نشان می‌دهد که بیان بیش از حد برخی از ژن‌های کلاس  $LEA^2$  منجر به افزایش تحمل به کم آبی می‌شود، پروتئین LEA ممکن است همچنین به عنوان مولکول‌های حفاظتی چاپرون برای جلوگیری از آسیب سلولی عمل کنند. سایر عوامل تنظیمی مانند پروتئین کیناز و آنزیم‌هایی که در بیوستت ABA موثر هستند نیز برای تحمل تنش در گیاهان مناسب بنظر می‌رسد. (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2007). فراتحلیل، مجموعه‌ای از ابزارهای آماری برای ترکیب مطالعات متعددی از یک فرضیه مرتبط است که در سال‌های اخیر در تحقیقات ژنومی طرفدار پیدا کرده است (Tseng et al. 2012). سیستم‌های امیکس با کارایی بالا مانند طیف سنجی جرمی MS و پروتئومیکس یا ریزآرایه DNA یا RNA-seq، این امکان را فراهم می‌آورند تا تجزیه و تحلیل جامعی از واکنش سامانه‌های زیستی در شرایط مختلف آزمایش بدست آید. چالش عمده فعلی در زیست‌شناسی سامانه‌ها، ترکیب و تجزیه و تحلیل جامع از مجموعه داده‌های بزرگ به دست آمده از این پلتفرم‌هاست (Kaeffer et al. 2014). ترکیب مطالعات گوناگون با توجه به فرضیات آزمایشی مشابه، قابلیت اطمینان نتایج را با افزایش قدرت آماری برای نشان دادن یک مجموعه معتبر و دقیق از ژن‌های متفاوت بیان شده (DEGs) افزایش می‌دهد. با این حال، تعداد کمی فراتحلیل میکروآرای در گیاهان گزارش شده، که بیشتر آنها در آرآیدوپسس انجام شده است. تاکنون، اطلاعات گسترده‌ای از داده‌های ترانسکریپتوم، از گونه‌های مختلف گیاه، مراحل رشد، بافت‌ها و شرایط آزمایشگاهی، در دسترس عموم قرار گرفته است (Shaar-Moshe et al. 2015). در تحقیق حاضر، سعی شده که فراتحلیل داده‌های میکروآرای برنج تحت تنش خشکی جمع‌آوری شده از پایگاه اطلاعاتی مختلف انجام شود و ژن‌های دارای بیان متفاوت (تظاهر بالا و پایین) و موثر در مکانیسم تحمل به تنش خشکی شناسایی شوند و هستی‌شناسی ژن‌های موثر در این فرآیند و شناسایی ژن‌های کلیدی درگیر در تحمل به تنش خشکی انجام گیرد و درستی فراتحلیل از طریق آزمایشگاهی تایید شود تا برخی از سازوکارهای مولکولی موثر در تحمل به این تنش شناسایی گردد.

## مواد و روش‌ها

داده‌های ترانسکریپتومی حاصل از تکنیک ریزآرایه از پایگاه NCBI GEO ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)) در پلتفرم‌های GPL2025, GPL21593 چهار سری داده با کیفیت از بین بیست داده ریزآرایه در خصوص تنش خشکی نسبت به نرمال تهیه شد (جدول ۱). شکل ۱ شمایی از جریان کاری فراتحلیل ریزآرایه را برای داده‌های مورد بررسی نشان می‌دهد.

<sup>۲</sup>. Late embryogenesis abundant

## جدول ۱. داده‌های استفاده شده در فراتحلیل از سری داده‌های ریزآرایه برنج تحت تنش خشکی

Table 1. The data used in the meta-analysis of the microarray data series of rice under drought stress

Accession	Platform	Part of plant	normal:stress	Drought treatments	Reference
GSE79212	GPL21593	seedlings	3:3	PEG 6000 (20%)	(Bhattacharjee et al. 2017)
GSE64576	GPL2025	leaf	2:2	PEG 6000 (18 or 20%)	(Xu et al. 2021)
GSE26280	GPL2025	Leaf	3:3	PEG solution	(Wang et al. 2011)
GSE6901	GPL2025	seedling	3:3	air-dried on a Whatmann sheet	(Sharma et al. 2014)

## پیش پردازش داده‌های ریزآرایه و شناسایی ژن‌های متفاوت بیان شونده: کیفیت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار

R تحت سیستم ویندوز با استفاده از PCA plot، boxplot و CorHeatmap بررسی شد و در صورت نیاز به نرمال‌سازی با استفاده از پکیج "normalize.quantiles" نرمال شد. داده‌های باکیفیت حاصل از تجزیه و تحلیل جداگانه داده‌ها انتخاب شد و آنالیز داده‌های بیانی با استفاده از پکیج "limma" انجام شد و ژن‌های متفاوت بیان شونده در آزمایش‌های مختلف شناسایی شد.

## فراتحلیل داده‌های ریزآرایه: فراتحلیل روی مجموعه داده‌ها با استفاده از پکیج "metaRNASeq" با روش یکی

کردن p-value ها انجام شد و ژن‌های با شرایط  $p\text{-values} \leq 0.05$  و  $\text{median log}_2 \text{fold change's value} > 1$  و  $< -1$  به عنوان ژن‌های متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای افزایش و کاهش بیان تحت تنش خشکی (metaDEG) شناسایی شد.

## تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن: تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن با استفاده از تارنمای PlantRegMap با آدرس

<http://plantregmap.gao-lab.org/> برای ژن‌های متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای افزایش و کاهش بیان تحت تنش خشکی از دیدگاه فرآیند زیستی اجرا شد (González-Gordo et al. 2019). در این مطالعه تنها GOهایی که  $p < 0.01$  به صورت معنی دار اعلام شدند انتخاب گردیدند.

## ترسیم نمودار ون: نمودار ون برای تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن‌های متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای افزایش و

کاهش بیان با استفاده از تارنمای Venny v2.1 با آدرس <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/> ترسیم شد.

شناسایی ژن‌های مرکزی<sup>۳</sup>: ترسیم شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین برای ژن‌های متفاوت بیان شونده (دارای افزایش

و کاهش بیان) فراتحلیل با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape بر روی اطلاعات گرفته شده از تارنمای STRING انجام شد و توسط سیتوها (CytoHubba) متصل به نرم‌افزار Cytoscape 3.9 (Chin et al. 2014) ژن‌های هاب یا مرکزی شبکه ژن‌های متفاوت بیان شونده فراتحلیل با روش Maximal Clique Centrality (MCC) شناسایی شد.

## آنالیز شبکه هم بیانی: شبکه هم بیانی برای ژن‌های مرکزی دارای افزایش و کاهش بیان با استفاده از تارنمای ATTED-

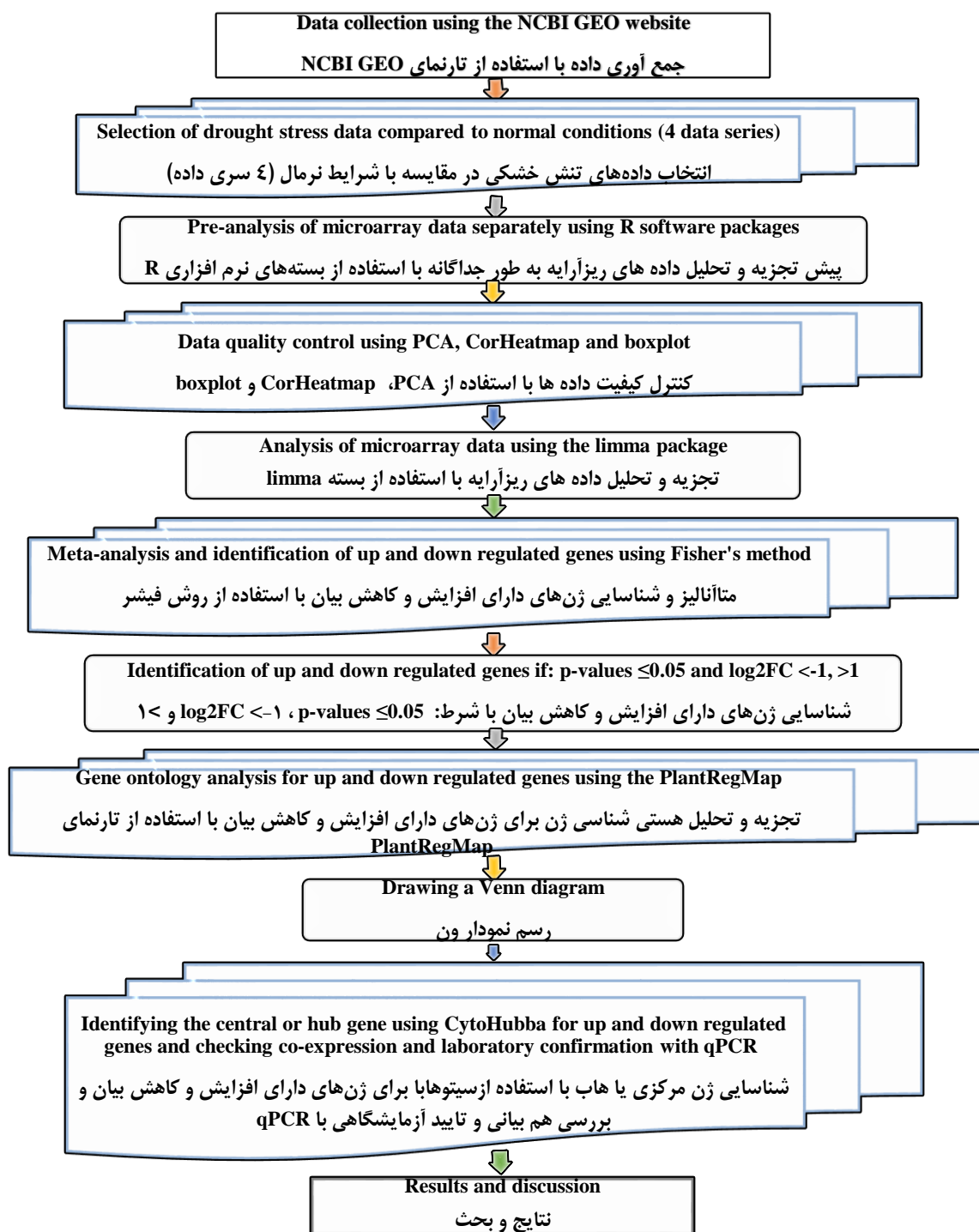
II با آدرس <https://atted.jp/coexsearch> بررسی شد.

## کشت بذر و اعمال تنش خشکی: کشت بذر برنج (هاشمی به عنوان رقم حساس به تنش خشکی و رقم بومی متحمل)

بر روی 1/2MS انجام شد. گیاهچه‌ها بعد از یک هفته به محیط کشت مایع 1/2 MS انتقال یافتند، بر روی گیاهان حاصل از برنج

<sup>۳</sup>. Hub gens

بعد از سه هفته در مرحله گیاهچه، تیمار خشکی با پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (شرکت مرک، Cat. 807491) در سه سطح صفر، بیست و چهل درصد (Devi et al. 2005; Gao et al. 2018) اعمال شد (شکل ۲).



شکل ۱. شمایی از جریان کار فراتحلیل ریزآرایه برای داده‌های مورد بررسی تحت تنش خشکی در گیاه برنج

Figure 1. An outline of the microarray meta-analysis workflow for the analyzed data under drought stress in rice plants

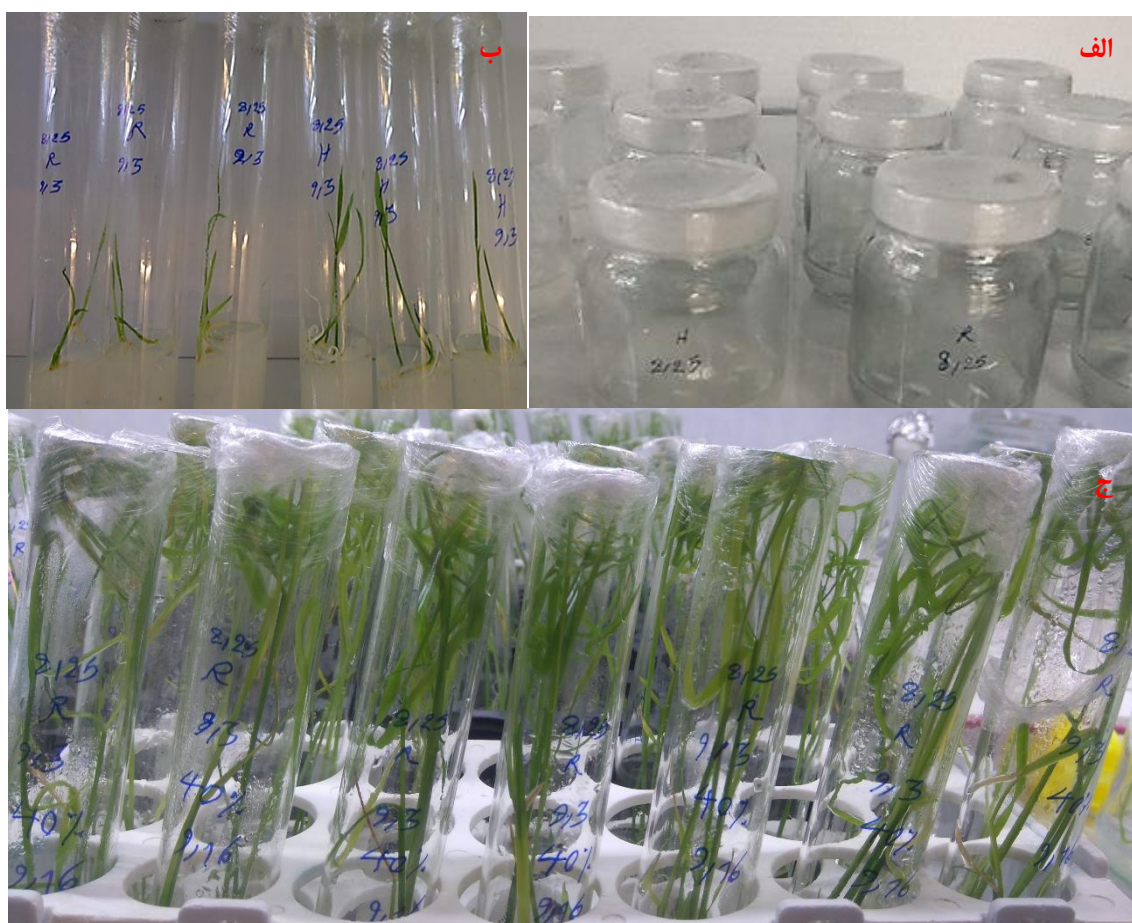


**آنالیز Real-time quantitative PCR:** برای بررسی کمی در qPCR از روش مقایسه‌ی نسبی استفاده شد. برای حذف نوسانات آزمایشی، مقادیر RNA وارد شده در واکنش و خطاهای فردی و عملکرد دستگاه از ژن‌های خانه دار یا-house keeping genes استفاده گردید. سنجش تغییرات در بیان ژن با استفاده از روش مقایسه‌ای دلتا دلتا سی تی ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) ارائه شده توسط لیواک و توماس انجام گرفت (Livak and Schmittgen 2001). در این آزمایش جهت نرمال نمودن داده‌های بدست آمده از qPCR از ژن خانه‌دار گلیسیرالدهید فسفات دهیدروژناز به عنوان ژن خانه‌دار (Ji et al. 2014) استفاده گردید. آغازگرها با استفاده از نرم افزار Primer Premier 5 برای بررسی بیان ژن انتخابی طراحی شدند و در BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) از نظر اندازه قطعه تکثیری مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۲). برای استخراج RNA گیاهان حاصل، ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش خشکی از روش تراپزول در سه تکرار استفاده شد. بعد از تایید کیفیت RNA استخراجی برای حذف DNA، تیمار DNaseI بر روی RNA استخراجی انجام شد و بعد از تایید عدم آلودگی با DNA، و بررسی کمیت RNA جهت ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفتند. در واکنش qPCR به دلیل استفاده از رنگ آشکارساز سایبرگرین، عدم وجود پرایمر دایمر و محصولات غیر اختصاصی ناشی از اتصال اشتباه پرایمر با استفاده از آنالیز منحنی ذوب در واکنش مورد نظر اثبات شد. وجود پیک‌های واضح و منفرد گواه بر تکثیر اختصاصی قطعات مورد نظر با کمک آغازگرهای ژن خانه‌دار و ژن‌های هدف می‌باشد. بیان ژن‌های مورد بررسی تحت تیمار تنش خشکی در دو رقم حساس و متحمل برنج بررسی شد. qPCR توسط دستگاه Q Gene-Rotor از (شرکت کیاژن)، با حجم نهایی ۲۰ (۱ میکرولیتر نمونه cDNA سنتز شده با غلظت صد نانوگرم در میکرولیتر (رقیق شده با نسبت ۱:۱۰)، یک میکرولیتر از هریک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ میکرومول، ۱۰ میکرولیتر کیت حاوی رنگ فلورسنت سایبرگرین و ۷ میکرولیتر آب مقطر استریل) انجام شد. پس از تایید تکثیر اختصاصی ژن‌ها بر اساس منحنی ذوب، داده‌های بدست آمده با استفاده از CT ژن خانه‌دار و ژن‌های مورد نظر میزان تغییرات بیان نسبی شرایط نرمال به تنش در دو رقم مختلف (هاشمی حساس به خشکی و رقم بومی متحمل) با روش مقایسه‌ای دلتا دلتا سی تی ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) با استفاده از نرم افزار Ecxl 2017 تجزیه شدند.

## نتایج

در این مطالعه از فراتحلیل برای ادغام نتایج آزمایش‌های متعدد به منظور بررسی محتمل‌ترین ژن‌های مسئول تحمل برنج به تنش خشکی استفاده شد (جدول ۱). روش کار فراتحلیل ریزآرایه در شکل ۱ نشان داده شده است. ۲۰ ژن از ۵۷۸ ژن با افزایش بیان و ۲۰ ژن از ۶۶۰ ژن با کاهش بیان در جدول ۳ ارائه شده است، ژن‌های Os02g0649300 (پروتئین HD-ZIP I در پاسخ به تنش)، Os05g0542500 و Os01g0705200 (پروتئین لئا)، Os05g0442400 (ترانسکریپشن فاکتور R-R-type MYB-like، Os09g0109600 (پپتید کوچک در تحمل خشکی *OsDSSRI*)، Os02g0513100 (شبه پیش ساز پروتئین MtN3، Os03g0286900 (پروتئین خانواده RCI2 مقاومت به خشکی)، Os09g0445600 (اکسیدوردوکتازها)، Os09g0325700 (پروتئین فسفاتاز 2C در پاسخ به تنش غیرزیستی)، Os07g0687900 (پروتئین WSI76 القا شده در تنش آبی)، Os11g0454000 (پروتئین Dehydrin RAB 16C در پاسخ به تنش خشکی افزایش بیان داشته است. ژن‌های Os08g0113000 (پیش ساز پراکسیداز ۴۷)، Os10g0100700 (پروتئین بیوسنتز ویتامین B6)، Os02g0704000 (پروتئین

خانواده کارتوتیید اکسیژناز)، Os03g0110900 (پروتئین حاوی دامنه دایمریک آلفا بتا)، Os08g0269700 (پروتئین فرضی حفاظت شده)، Os09g0275400 (پروتئین خانواده سیتوکروم P450)، Os01g0332800 (شبه پروتئین شبه سرین کربوکسی پپتیداز II)، Os01g0179600 (پروتئین خانواده UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase) و برخی ژن‌های دیگر کاهش بیان داشته است. تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن (GO) در فرآیند زیستی بر روی تمام ژن‌های متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای افزایش و کاهش بیان پاسخ‌دهنده به خشکی بر اساس تارنمای [plantregmap \(http://plantregmap.gao-lab.org\)](http://plantregmap.gao-lab.org) انجام شد. در مجموع ۸۳ و ۶۵ اصطلاح هستی‌شناسی (GO) به ترتیب در ژن‌های متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای افزایش و کاهش بیان بدست آمدند (جدول ۴). نمودارهای ون (Venn Diagram) برای GO ژن‌های متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای افزایش و کاهش بیان ایجاد شد (شکل ۳).



شکل ۲. کشت بذور برنج بر روی 1/2 MS (الف)، انتقال گیاهچه‌ها بعد از یک هفته به محیط کشت مایع (ب)، اعمال تنش خشکی در گیاهچه‌ها بعد از سه هفته با پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ در سه سطح صفر ۲۰ و ۴۰ درصد (ج)

**Figure 2. A: Cultivation of rice seeds on 1/2 MS, B: Transfer of seedlings to liquid culture medium after one week, C: Applying drought stress to seedlings after three weeks with polyethylene glycol 6000 in three Zero level 20 and 40 percent**

## جدول ۲. آغازگرهای طراحی شده برای استفاده در qPCR

Table 2. Designed primers for use in qPCR

توالی آغازگر ۳'-۵'	نام ژن	دمای ذوب	طول قطعه
Sequence (5'-3')	Gene name	Tm (°C)	Length (bp)
F:GACAAGAGGAATAGCGTGATGAA R:CCGCCCAAGTAGTCTAGGTGA	<i>Homeobox-leucine zipper protein</i>	58.5 60.9	161
F:ATCACTTACCCACAGCACA R:GCGGAGCTAATTCATCCTTG	<i>OsDSSRI</i>	60.2 59.8	219
F:TTGCCCGCCTTAGCTCTTT R:GGCCTCCATGCCACAATACA	<i>Peroxidase 47</i>	59.6 60.4	199
F:CGGAGCGACTCGATGAACA R:TTCGGTTGGTTGGCGTGAG	Uncharacterized	59.8 60.8	202
F:AAGCCAGCATCCTATGATCAGATT R:CGTAACCCAGAATACCCTTGAGTTT	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2</i>	59.9 60.8	79

جدول ۳. ژن‌های متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای افزایش و کاهش بیان در تنش خشکی *Oryza sativa* L. و جزئیات ژن‌های متفاوت بیان شونده فراتحلیل

Table 3. meta-analysis differential expression genes with up and down regulation in *Oryza sativa* L. drought stress and details of meta-analysis differential expression genes

Up-regulated genes				Down-regulated genes			
Gene.ID	MSU ID (LOC_Os)	Log <sub>2</sub> FC	description	Gene.ID	MSU ID (LOC_Os)	Log <sub>2</sub> FC	description
4330155	Os02g0649300	6.1	HD-ZIP 1 protein, Transcription activator, Stress response	4344496	Os08g0113000	-3.4	Similar to Peroxidase 47 precursor
4339480	Os05g0542500	5.2	Similar to Isoform 2 of Late embryogenesis abundant protein	4347937	Os10g0100700	-3.1	Vitamin B6 biosynthesis protein family protein
4324254	Os01g0705200	5.1	Late embryogenesis abundant protein repeat containing protein	4349078	None	-3.0	None
4338925	Os05g0442400	5.0	R-R-type MYB-like transcription factor, Response to drought stress	4347042	Os09g0412700	-3.0	Conserved hypothetical protein
4346387	Os09g0109600	5.0	OsDSSRI, Small peptide, Drought toleranc	4329191	None	-3.0	None
4341949	None	4.9	None	4330451	Os02g0704000	-2.6	Carotenoid oxygenase family protein
4329464	Os02g0513100	4.7	Similar to MtN3 protein precursor	9267111	Os03g0110900	-2.6	Dimeric alpha-beta barrel domain containing protein
4332481	Os03g0286900	4.3	RCI2 (rare cold-inducible 2) family protein, Drought resistanc	4338117	None	-2.5	None
4347198	Os09g0445600	4.1	Similar to oxidoreductase/ transition metal ion binding protein	4351321	None	-2.5	None
4346736	Os09g0325700	4.0	Protein phosphatase 2C, Abiotic stress response	4345134	Os08g0269700	-2.4	Conserved hypothetical protein
4344351	Os07g0687900	3.9	WSI76 protein induced by water stress	4346594	Os09g0275400	-2.4	Cytochrome P450 family protein
4350452	Os11g0454000	3.8	Dehydrin RAB 16C	4326840	Os01g0332800	-2.4	Similar to Serine carboxypeptidase II-like protein
4331521	Os03g0133100	3.8	Conserved hypothetical protein	4323880	Os01g0179600	-2.3	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase family protein
4341691	Os06g0651200	3.8	Conserved hypothetical protein	4339878	Os06g0109200	-2.3	Protein of unknown function DUF6
4347252	Os09g0455300	3.7	Similar to INDEHISCENT protein	4349349	Os10g0555900	-2.3	Similar to Beta-expansin
4325256	Os01g0214500	3.7	Conserved hypothetical protein	4326073	Os01g0117900	-2.3	Similar to nodulin-like protein
4343597	Os07g0561300	3.7	Cyclin-like F-box domain containing protein	4331629	Os03g0149300	-2.3	Protein of unknown function DUF6
4332995	Os03g0386000	3.6	Similar to Salt-responsive WD40 protein 5	4326605	Os01g0635200	-2.2	Homeodomain-like containing protein
4341858	Os06g0681200	3.6	Cupredoxin domain containing protein	9269069	Os12g0105300	-2.2	Actin-binding FH2 domain containing protein
4331577	Os03g0141200	3.5	Similar to Beta-amylase PCT-BMYI	4343353	Os07g0510500	-2.2	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase family protein

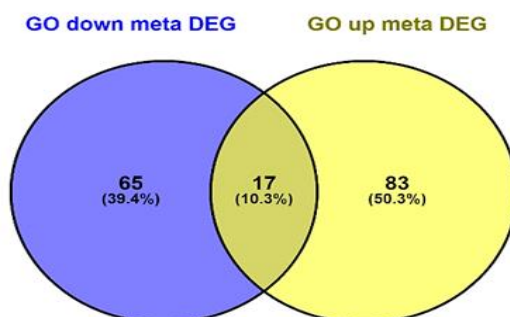
۱۷ عنصر مشترک بین GO ژن‌های متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای افزایش و کاهش بیان بود مانند GO:0009314 (پاسخ به تشعشع)، GO:0009628 (پاسخ به محرک غیر زیستی)، GO:0010033 (پاسخ به مواد آلی)، GO:0009725 (پاسخ به هورمون)، GO:0009719 (پاسخ به محرک‌های درون‌زا)، GO:0009416 (پاسخ به محرک نور)، GO:0042221 (پاسخ به مواد شیمیایی)، GO:0006950 (پاسخ به استرس) و ... می باشد که این GO های مشترک مختص پاسخ به عوامل تنش‌زا می باشد (جدول ۵).

جدول ۴. ۲۰ دسته فرآیندهای زیستی هستی‌شناسی ژن (GO) از ژن‌های متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای افزایش و کاهش بیان پاسخ به خشکی در برنج. تجزیه و تحلیل GO ژن‌های پاسخ‌دهنده به خشکی توسط PlantRegMap اجرا شد و فرآیندهای زیستی GO با  $p < 0.01$  در این مطالعه بررسی شد

**Table 4. 20 Gene Ontology (GO) categories of biological processes from meta-analysis differential expression genes with up and down regulation in response to drought in rice. GO analysis of drought-responsive genes was performed by PlantRegMap, and GO biological processes with  $p < 0.01$  were investigated in this study**

Leaf up				Leaf down			
GO term	Description	Number in input list	P-value	GO term	Description	Number in input list	P-value
GO:1901700	Response to oxygen-containing compound	39	3.20E-10	GO:0044699	Single-organism process	217	2.60E-13
GO:0001101	Response to acid chemical	32	3.00E-09	GO:0015979	Photosynthesis	24	2.60E-12
GO:0051187	Cofactor catabolic process	7	6.30E-09	GO:0044763	Single-organism cellular process	174	4.80E-12
GO:0009737	Response to abscisic acid	22	8.90E-09	GO:0044710	Single-organism metabolic process	131	3.20E-09
GO:0097305	Response to alcohol	23	2.60E-08	GO:0006364	rRNA processing	16	1.70E-07
GO:0044699	Single-organism process	174	6.10E-08	GO:0016072	rRNA metabolic process	16	1.80E-07
GO:0015996	Chlorophyll catabolic process	6	7.10E-08	GO:0055114	Oxidation-reduction process	65	2.80E-07
GO:0046149	Pigment catabolic process	6	1.10E-07	GO:0015995	Chlorophyll biosynthetic process	8	2.90E-07
GO:0006787	Porphyrin-containing compound catabolic process	6	1.60E-07	GO:0042254	Ribosome biogenesis	19	8.20E-07
GO:0033015	Tetrapyrrole catabolic process	6	1.60E-07	GO:0050896	Response to stimulus	106	9.80E-07
GO:0050896	Response to stimulus	95	3.50E-07	GO:0034470	ncRNA processing	19	1.30E-06
GO:0033993	Response to lipid	22	6.10E-07	GO:0006779	Porphyrin-containing compound biosynthetic process	8	1.80E-06
GO:0009628	Response to abiotic stimulus	41	1.30E-06	GO:0033014	Tetrapyrrole biosynthetic process	8	3.40E-06
GO:0009414	Response to water deprivation	14	1.40E-06	GO:0071840	Cellular component organization or biogenesis	69	5.90E-06
GO:0009415	Response to water	14	1.70E-06	GO:0019684	Photosynthesis, light reaction	11	7.20E-06
GO:0034654	Nucleobase-containing compound biosynthetic process	58	1.80E-06	GO:0015994	Chlorophyll metabolic process	8	8.80E-06
GO:0010033	Response to organic substance	38	2.70E-06	GO:0034660	ncRNA metabolic process	20	1.20E-05
GO:0018130	Heterocycle biosynthetic process	61	2.90E-06	GO:0022613	Ribonucleoprotein complex biogenesis	19	2.00E-05
GO:0051252	Regulation of RNA metabolic process	51	3.10E-06	GO:0006778	Porphyrin-containing compound metabolic process	8	3.80E-05
GO:0006355	Regulation of transcription, DNA-templated	50	3.30E-06	GO:0030154	Cell differentiation	18	3.90E-05

برای شناسایی روابط بیولوژیکی بین ژن‌ها، ترسیم شبکه PPI با استفاده از Cytoscape نسخه ۳,۹,۱ و با استفاده از تارنمای STRING نسخه ۱۱,۵ برای ژن‌های متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای افزایش و کاهش بیان تحت تنش خشکی به طور جداگانه انجام شد (شکل ۴، ۵).



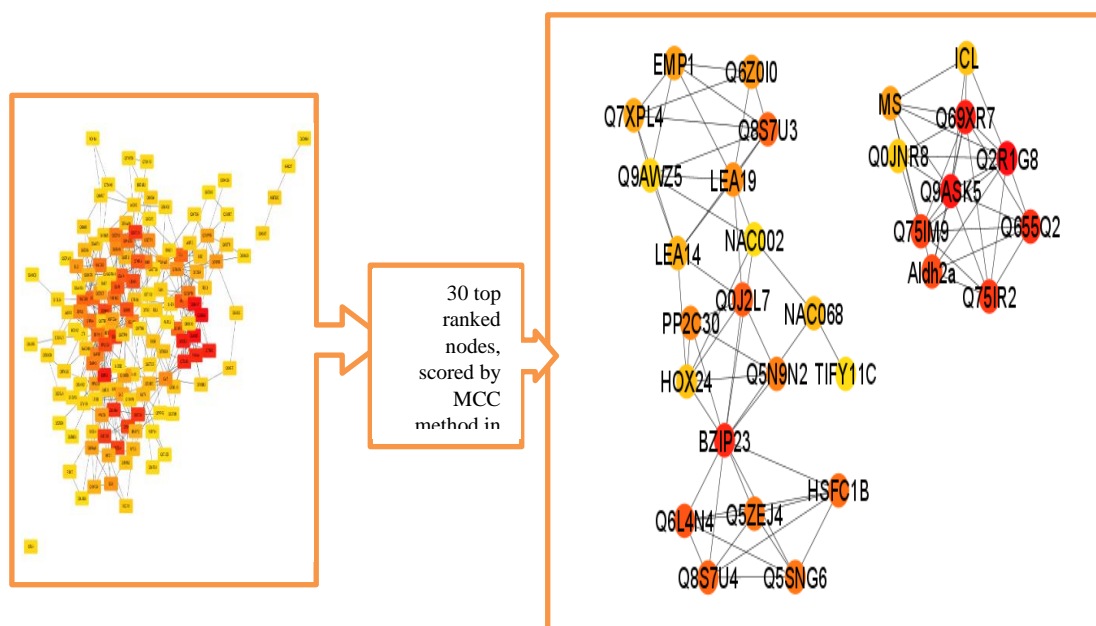
شکل ۳. نمودارهای ون ژن‌های متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای افزایش و کاهش بیان تحت تنش خشکی. مقایسه تعدادی از ژن‌های متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای افزایش و کاهش بیان از *Oryza sativa* L. مشترک را نشان می‌دهد.

**Figure 3. Venn diagrams of meta-analysis differential expression genes with up and down regulation under drought stress. Comparison of a number of meta-analysis differentially expressed genes with increased and decreased expression show 17 GO common from *Oryza sativa* L.**

جدول ۵. تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن مشترک برای ژن‌های متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای افزایش و کاهش بیان تحت تنش خشکی در نمودار ون

**Table 5. Common gene ontology for meta-analysis differential expression genes with up and down regulation under drought stress in Venn diagram**

Common elements GO in up and down	Description
GO:0044699	single-organism process
GO:0044763	single-organism cellular process
GO:0044710	single-organism metabolic process
GO:0050896	response to stimulus
GO:0015994	chlorophyll metabolic process
GO:0006778	porphyrin-containing compound metabolic process
GO:0033013	tetrapyrrole metabolic process
GO:0009314	response to radiation
GO:0009628	response to abiotic stimulus
GO:0010033	response to organic substance
GO:0009725	response to hormone
GO:0009719	response to endogenous stimulus
GO:0009416	response to light stimulus
GO:0042221	response to chemical
GO:0006950	response to stress
GO:0044281	small molecule metabolic process
GO:0044712	single-organism catabolic process



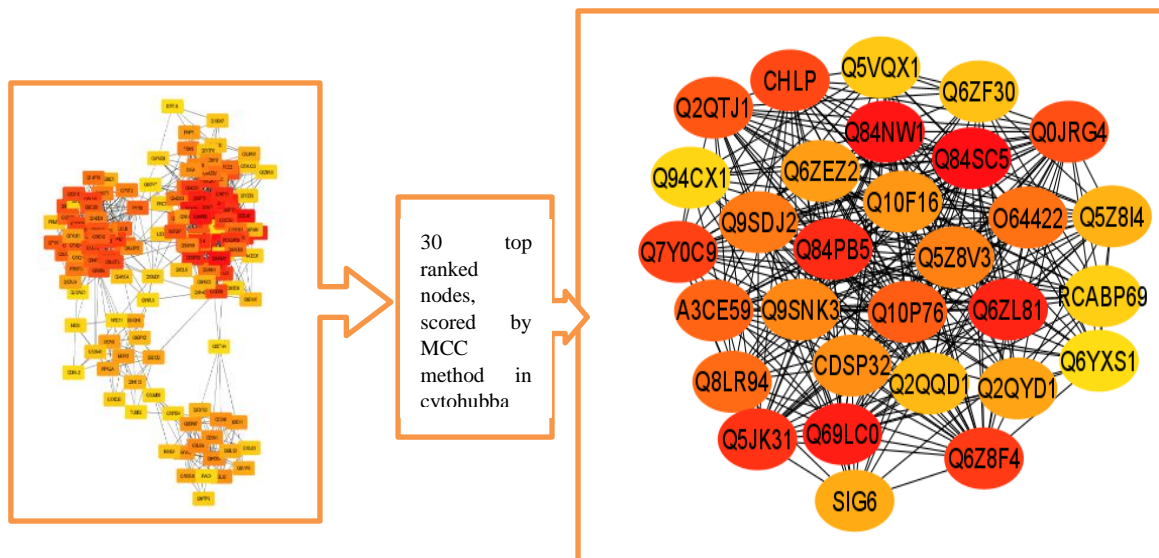
شکل ۴. شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین (PPI) ژن‌های متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای افزایش بیان تحت تنش خشکی. با استفاده از cyto-Hubba ژن‌های دارای افزایش بیان در Cytoscape (نسخه ۳٫۹٫۱) تجزیه و تحلیل شد و ۳۰ ژن هاب یا مرکزی رتبه بندی شده بر اساس امتیازات MCC از شبکه انتخاب شدند. ژن‌های هاب با رنگ قرمز (بسیار ضروری) تا زرد (ضروری) نشان داده شده اند

**Figure 4. Protein-protein interaction (PPI) network of meta- analysis differential expression genes for up-regulation genes under drought stress. Using cyto-Hubba, up regulation genes analyzed in Cytoscape (version 3.9.1), 30 hub genes ranked based on MCC scores were selected from the network. Hub genes are shown in red (highly essential) to yellow (essential)**

۳۰ ژن از بین ژن‌های متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای افزایش بیان از جمله Acyl-CoA اکسیداز (Q2R1G8)، استیل-کوآ C-استیل ترانسفراز (Q9ASK5)، آسیل کوآنزیم A اکسیداز ۳ (Q69XR7)، فاکتور رونویسی bZIP تنظیم سیگنال دهی و بیوستنز ABA و مقاومت به خشکی (BZIP23)، پروتئین حاوی دامنه کاتالیزوری اجزای کمپلکس‌های مختلف دهیدروژناز (Q655Q2)، آسیل کوآنزیم A اکسیداز ۴ (Q75IR2)، شبه ایزووایل کوآ دهیدروژناز (Q75IM9)، میتوکندری آلدهید دهیدروژناز ALDH2a، پروتئین انگشت روی پشت سرهم CCCH، فتومورفوژن و پاسخ‌های ABA، استرس غیرزیستی (Q6L4N4) و پروتئین فسفاتاز 2C (Q0J2L7)، پروتئین فراوان اواخر جنین‌زایی (Q8S7U3)، فاکتور رونویسی استرس گرمایی C-1b (HSFC1B)، شبه فاکتور اتصال I-box (Q5SNG6)، پروتئین فرضی حفاظت شده، شبه پروتئین فسفاتاز 2C (Q5N9N2)، پروتئین احتمالی فسفاتاز 2C 30 (PP2C30)، پروتئین فراوان در اواخر جنین‌زایی ۱۹ (LEA19)، پروتئین فراوان اواخر جنین‌زایی دیررس LEA خانواده گروه ۱ (Q6Z0I0)، ملات سنتاز (MS)، فاکتور رونویسی bZIP- (EMP1)TRAB1، شبه پیش ساز پروتئین Cor14b (Q7XPL4)، پروتئین فراوان در اواخر جنین‌زایی ۱۴ (LEA14)، پروتئین حاوی دامنه NAC 68 (NAC068)، ایزوسیترات لیاز (ICL)، پروتئین HD-ZIP I فعال کننده رونویسی، پاسخ به تنش



(HOX24)، شبه Hydroxymethylglutaryl-CoA لیاز (Q0JNR8)، شبه دهیدرین (Q9AWZ5)، پروتئین حاوی دامنه NAC 2 (NAC002) و پروتئین TIFY11c (TIFY11C) به عنوان ژن مرکزی مطرح هستند. اکثر ژن‌های مرکزی متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای افزایش بیان به سازوکارهای مختلفی تعلق دارند که در تحمل به تنش خشکی نقش دارند (جدول ۶).



شکل ۵. شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین (PPI) ژن‌های متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای کاهش بیان تحت تنش خشکی. با استفاده از cyto-Hubba از ژن‌های دارای کاهش بیان در Cytoscape (نسخه ۳،۹،۱) تجزیه و تحلیل شد و ۳۰ ژن هاب یا مرکزی رتبه‌بندی شده بر اساس امتیازات MCC از شبکه انتخاب شدند. ژن‌های هاب با رنگ قرمز (بسیار ضروری) تا زرد (ضروری) نشان داده شده اند

**Figure 5. Protein-protein interaction (PPI) network of differentially expressed meta-genes for down-regulated genes under drought stress. Using cyto-Hubba, down regulation genes analyzed in Cytoscape (version 3.9.1), 30 hub genes ranked based on MCC scores were selected from the network. Hub genes are shown in red (highly essential) to yellow (essential)**

ژن‌های متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای کاهش بیان از جمله پروتئین خانواده پروتئین  $Fe(Cys)_4$  از نوع روبردوکسین (Q84SC5)، زنجیره گامای ATP سنتاز (Q84NW1)، پروتئین حاوی دامنه ماریچ مانند تتراتریکوپپتید (Q69LC0)، فسفوپروتئین غشای تیلاکوئید ۱۴ کیلودالتون (Q6ZL81)، پروتئین شبه پروتئین فتوسیستم I (Q84PB5)، پروتئین فرضی حفاظت شده (Q5JK31)، شبه فسفریولوکیناز (Q6Z8F4)، پروتئین حاوی دامنه PetM زیرواحد ۷ کمپلکس سیتوکروم b6/f (Q7Y0C9)، ژرانیل ژرانیل دی فسفات ردوکتاز (CHLP)، پروتئین حاوی دامنه شیکیمات کیناز شبه mRNA زیر واحد کوچک ریبولوز ۱،۵-بیس فسفات کربوکسیلاز (Q0JRG4)، پروتئین شوک حرارتی DnaJ (Q10P76)، پروتئین حاوی دامنه FH2 متصل به اکتین (A3CE59)، پروتئین با عملکرد ناشناخته دامنه DUF3007 (Q8LR94)، شبه فروکتوز-۱،۶-بیس فسفاتاز (O64422)، زیرواحد منیزیم پروتوپورفیرین IX منو متیل استر سیکلاز (Q9SDJ2)، پروتئین تیلاکوئید لومنال 13.3 کیلو دالتون (Q5Z8V3)، گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز (Q9SNK3)، پروتئین حاوی دامنه ۲ تیوردوکسین (CDSP32)، شبه فردوکسین (Q10F16)، پیش ساز ریبولوز-۵-فسفات ایزومراز (Q6ZEZ2)، پروتئین حاوی دامنه FHA (Q2QYD1)، فاکتور

سیگما RNA پلیمرز (SIG6)، پروتئین تثبیت نیتروژن (Q5Z8I4)، پروتئین حاوی دامنه DnaJ (Q2QQD1)، پروتئین نوع III کلروفیل a/b اتصال دهنده (Q6ZF30)، Mog1/PsbP، پروتئین حاوی دامنه ساندویچ آلفا/بتا/آلفا (Q5VQX1)، پروتئین اتصال کلروفیل a-b (RCABP69)، پروتئین لومن تیلاکوئید، فتوسنتز و توسعه کلروپلاست (Q94CX1) و پروتئین فرضی حفاظت شده (Q6YXS1) هستند (جدول ۷). اکثر ژن‌های مرکزی متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای کاهش بیان به سازوکارهای مختلفی تعلق دارند که فتوسنتز را تحت تنش خشکی سرکوب می‌کند.

جدول ۶. ژن‌های مرکزی متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای افزایش بیان تحت تنش خشکی بر روی برنج، امتیازدهی به روش MCC در cyto-Hubba متصل به Cytoscape (نسخه ۳٫۹٫۱)

**Table 6. Hub genes of up regulation meta- differential expression genes under drought stress on rice, scoring by MCC method in cyto-Hubba plugin in Cytoscape (version 3.9.1)**

Rank	Names	Gene Name	Score	Description
1	Q2R1G8	Os11g0605500	352	Acyl-CoA oxidase
2	Q9ASK5	Os01g0110400	345	Similar to Acetyl-CoA C-acetyltransferase
3	Q69XR7	Os06g0354500	340	Similar to Acyl-coenzyme A oxidase 3, peroxisomal precursor
4	BZIP23	Os02g0766700	252	bZIP transcription factor, Regulation of ABA signaling and biosynthesis, Drought resistanc
5	Q655Q2	Os01g0314100	250	Catalytic domain of components of various dehydrogenase complexes containing protein
6	Q75IR2	Os05g0163700	243	Similar to Acyl-coenzyme A oxidase 4, peroxisomal
7	Q75IM9	Os05g0125500	197	Similar to Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor
8	Aldh2a	Os02g0730000	150	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase ALDH2a
9	Q6L4N4	Os05g0195200	128	CCCH-tandem zinc finger protein, Photomorphogenesis and ABA responses, Abiotic stress
10	Q0J2L7	Os09g0325700	125	Protein phosphatase 2C, Abiotic stress response
11	Q8S7U4	Os03g0168200	122	Similar to F16A14.21
12	Q8S7U3	Os03g0168100	122	Late embryogenesis abundant protein repeat containing protein
13	HSFC1B	Os01g0733200	121	Heat stress transcription factor C-1b
14	Q5SNG6	Os01g0192300	120	Similar to I-box binding factor
15	Q5ZEJ4	Os01g0151600	120	Conserved hypothetical protein
16	Q5N9N2	Os01g0846300	110	Similar to Protein phosphatase 2C
17	PP2C30	Os03g0268600	108	Probable protein phosphatase 2C 30
18	LEA19	Os05g0542500	98	Late embryogenesis abundant protein 19
19	Q6Z0I0	Os08g0327700	91	Late embryogenesis abundant (LEA) group 1 family protein
20	MS	Os04g0486950	87	Malate synthase
20	EMP1	Os08g0472000	87	bZIP transcription factor TRAB1
22	Q7XPL4	Os04g0610600	56	Similar to Cor14b protein precursor
23	LEA14	Os01g0705200	49	Late embryogenesis abundant protein 14
24	NAC068	Os01g0816100	43	NAC domain-containing protein 68
25	ICL	Os07g0529000	42	Isocitrate lyase
26	HOX24	Os02g0649300	42	HD-ZIP I protein, Transcription activator, Stress response
27	Q0JNR8	Os01g0269000	38	Similar to Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase
28	Q9AWZ5	Os01g0225600	37	Similar to Dehydrin
29	NAC002	Os03g0815100	33	NAC domain-containing protein 2
29	TIFY11C	Os03g0180900	33	Protein TIFY 11c

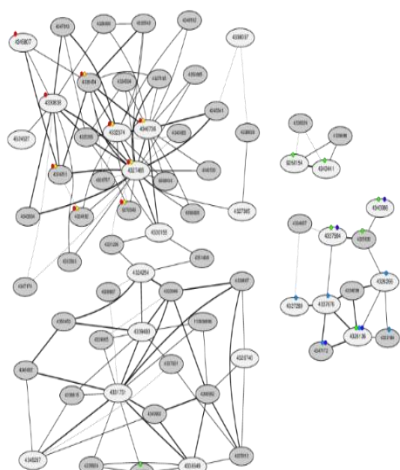


جدول ۷. ژن‌های مرکزی متفاوت بیان شونده فراتحلیل دارای کاهش بیان تحت تنش خشکی بر روی برنج، امتیازدهی به روش MCC در cyto-Hubba متصل به Cytoscape (نسخه ۳،۹،۱).

**Table 7. Hub genes of down regulation meta differential expression genes under drought stress on rice, scoring by MCC method in cyto-Hubba plugin in Cytoscape (version 3.9.1).**

Rank	Names	Gene Name	Score	Description
1	Q84SC5	Os08g0162600	2.52E+08	Rubredoxin-type Fe(Cys) <sub>4</sub> protein family protein
2	Q84NW1	Os07g0513000	2.51E+08	Similar to ATP synthase gamma chain, chloroplast
3	Q69LC0	Os07g0171100	2.49E+08	Tetratricopeptide-like helical domain containing protein
4	Q6ZL81	Os07g0469100	2.46E+08	Similar to Thylakoid membrane phosphoprotein 14 kDa
5	Q84PB5	Os07g0148900	2.43E+08	Photosystem I protein-like protein
6	Q5JK31	Os01g0929100	2.36E+08	Conserved hypothetical protein
7	Q6Z8F4	Os02g0698000	2.26E+08	Similar to Phosphoribulokinase, chloroplast precursor
8	Q7YOC9	Os03g0765900	2.21E+08	PetM of cytochrome b6/f complex subunit 7 domain containing protein
9	CHLP	Os02g0744900	1.89E+08	Geranylgeranyl diphosphate reductase, chloroplastic
10	Q0JRG4	Os01g0102600	1.87E+08	Shikimate kinase domain containing protein
11	Q2QJT1	Os12g0292400	1.46E+08	Similar to Petunia ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit mRNA
12	Q10P76	Os03g0244000	1.38E+08	Heat shock protein DnaJ, cysteine-rich region domain containing protein
13	A3CE59	Os12g0105300	1.01E+08	Actin-binding FH2 domain containing protein
14	Q8LR94	Os01g0805200	9.83E+07	Protein of unknown function DUF3007 domain containing protein
15	O64422	Os03g0267300	6.10E+07	Similar to Fructose-1,6-bisphosphatase, chloroplast precursor
16	Q9SDJ2	Os01g0279100	5.09E+07	Subunit of magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase
17	Q5Z8V3	Os06g0705100	2.59E+07	Similar to Thylakoid lumenal 13.3 kDa protein
18	Q9SNK3	Os03g0129300	1.37E+07	Similar to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
19	CDSP32	Os07g0476900	5949434	Thioredoxin domain 2 containing protein
20	Q10F16	Os03g0685000	2037698	Similar to Ferredoxin
21	Q6ZEZ2	Os07g0176900	1858648	Similar to Ribose-5-phosphate isomerase precursor
22	Q2QYD1	Os12g0124000	1632146	Similar to FHA domain containing protein
23	SIG6	Os08g0242800	1628142	RNA polymerase sigma factor
24	Q5Z8I4	Os06g0694500	1450681	Similar to Nitrogen fixation like protein
25	Q2QQD1	Os12g0498500	783363	Similar to DnaJ domain containing protein
26	Q6ZF30	Os07g0562700	466077	Similar to Type III chlorophyll a/b-binding protein
27	Q5VQX1	Os01g0805300	424360	Mog1/PsbP, alpha/beta/alpha sandwich domain containing protein
28	RCABP69	Os07g0558400	423054	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic
29	Q94CX1	Os01g0102300	293762	Thylakoid lumen protein, Photosynthesis and chloroplast developmen
30	Q6YXS1	Os08g0114100	200311	Conserved hypothetical protein

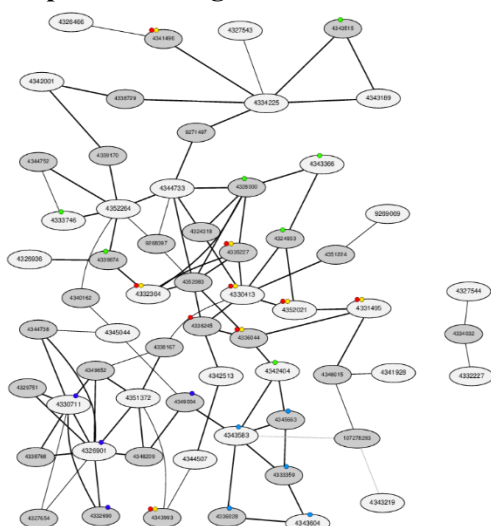
نتایج بررسی شبکه هم بیانی ژن‌های مرکزی بیان شونده، نشان‌دهنده ژن‌های مؤثر و مرتبط در مسیرهای عملکردی ژن‌های مرکزی می‌باشد بررسی هم بیانی ژن‌های مرکزی دارای افزایش بیان پاسخ دهنده به تنش خشکی در برنج، با ژن‌های مسیر انتقال سیگنال هورمون‌های گیاهی، مسیر پیام‌رسانی MAPK، متابولیسم کربن و تجزیه ایزولوسین، لوسین و والین و تجزیه اسیدهای چرب می‌باشد (شکل ۶) و هم چنین بررسی هم بیانی ژن‌های مرکزی دارای کاهش بیان پاسخ دهنده به تنش خشکی با ژن‌های مسیر متابولیسم کربن، تثبیت کربن در موجودات فتوسنتز کننده، مسیر فتوسنتز، پروتئین‌های آنتن فتوسنتزی و متابولیسم کلروفیل و پورفیرین می‌باشد (شکل ۷).



KEGG ID	Title	genes	Link to the KEGG map (Multiple genes)
osa04075	Plant hormone signal transduction	9	●
osa04016	MAPK signaling pathway - plant	7	●
osa01200	Carbon metabolism	7	●
osa00280	Valine, leucine and isoleucine degradation	6	●
osa00071	Fatty acid degradation	4	●

شکل ۶. بررسی هم بیانی ژن‌های مرکزی متفاوت بیان شونده دارای افزایش بیان با استفاده از تارنمای ATTED-II تحت تنش خشکی روی برنج

Figure 6. Co-expression analysis of differentially expressed hub genes with increased expression using the ATTED-II site under drought stress on rice



KEGG* ID	Title	enes	Link to the KEGG* map (Multiple genes)
osa01200	Carbon metabolism	9	●
osa00710	Carbon fixation in photosynthetic organisms	8	●
osa00195	Photosynthesis	7	●
osa00196	Photosynthesis - antenna proteins	5	●
osa00860	Porphyrim and chlorophyll metabolism	4	●

شکل ۷. بررسی هم بیانی ژن‌های مرکزی متفاوت بیان شونده دارای کاهش بیان با استفاده از تارنمای ATTED-II تحت تنش خشکی روی برنج

Figure 7. Co-expression analysis of differentially expressed hub genes with decreased expression using the ATTED-II site under drought stress on rice

نتایج مربوط به ژن دارای افزایش بیان فراتحلیل *homeobox-leucine zipper protein* و ژن

*OsDSSRI*: نتایج آنالیز qPCR نشان داد که میزان بیان *homeobox-leucine zipper protein* در ژنوتیپ حساس و ژنوتیپ مقاوم در تمام ساعات تنش، در هر دو رقم حساس هاشمی و لاین بومی متحمل افزایش بیان مشاهده شد، نتایج این آزمایش همسو با نتایج فراتحلیل بود و افزایش بیان در ژن مورد نظر مشاهده شد. میزان افزایش بیان در هر دو ژنوتیپ در ۲۴ ساعت بیشتر

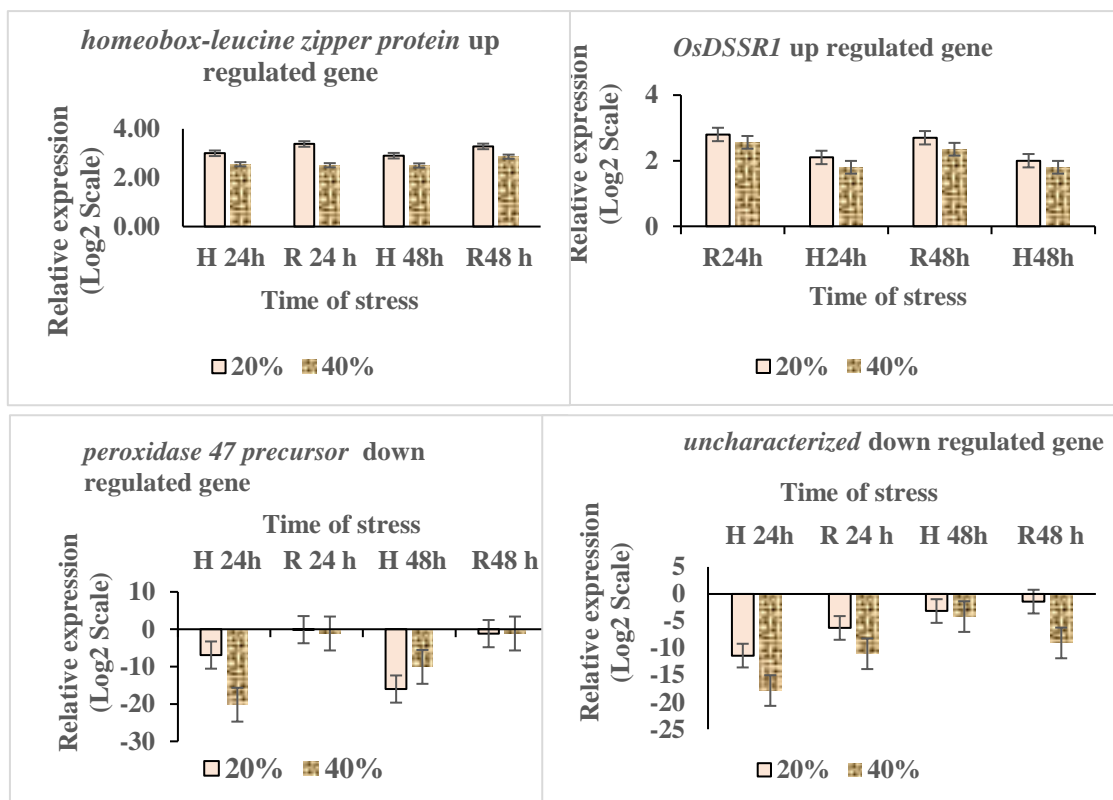
از ۴۸ ساعت بود و همچنین در سطح خشکی ۲۰ درصد افزایش بیان بیشتری مشاهده گردید و میزان بیان *OsDSSRI* در ژنوتیپ حساس و ژنوتیپ مقاوم در تمام ساعات تنش، در هر دو رقم حساس هاشمی و لاین مقاوم R افزایش بیان مشاهده شد، نتایج این آزمایش همسو با نتایج فراتحلیل بود. و همچنین در سطح خشکی ۲۰ درصد افزایش بیان بیشتری مشاهده گردید و افزایش بیان در ژن مورد نظر مشاهده شد (شکل ۸).

#### نتایج مربوط به ژن دارای کاهش بیان فراتحلیل پیش ساز *peroxidase 47* و ژن ناشناخته: نتایج آنالیز

qPCR نشان داد که پیش ساز *peroxidase 47* در ژنوتیپ حساس و ژنوتیپ مقاوم روند متفاوتی داشت. میزان کاهش بیان این ژن در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تنش در رقم حساس هاشمی در دو سطح ۲۰ و ۴۰ درصد خشکی بیشتر از لاین مقاوم R بود. در لاین R ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت پس از تیمار خشکی کاهش کمتری از بیان این ژن در مقایسه با شاهد مشاهده شد. میزان کاهش بیان این ژن در ۲۴ ساعت در ژنوتیپ هاشمی بیشتر از لاین R بود. در ژنوتیپ هاشمی بیشترین کاهش بیان در سطح ۴۰ درصد خشکی و ۲۴ ساعت پس از تیمار دیده می شود. نتایج این آزمایش همسو با نتایج فراتحلیل بود و کاهش بیان در ژن مورد نظر مشاهده شد و ژن ناشناخته دارای کاهش بیان در نتایج فراتحلیل، در ژنوتیپ حساس و ژنوتیپ مقاوم روند متفاوتی داشت. میزان کاهش بیان این ژن در ۲۴ ساعت بعد از تنش در رقم حساس هاشمی در دو سطح ۲۰ و ۴۰ درصد خشکی بیشتر از لاین مقاوم R بود. در هر دو ژنوتیپ بیشترین کاهش بیان در سطح ۴۰ درصد خشکی و ۲۴ ساعت پس از تیمار دیده می شود. نتایج این آزمایش همسو با نتایج فراتحلیل بود و کاهش بیان در ژن مورد نظر مشاهده شد (شکل ۸).

#### بحث

گیاهان زراعی در معرض چندین تنش محیطی قرار دارند که همگی بر رشد و نمو گیاهان تأثیر می گذارند که در نتیجه بهره‌وری گیاهان زراعی را مختل می کند. کمبود آب تولید پایدار محصولات کشاورزی را تهدید می نماید (Karaba et al. 2007). تنش خشکی مخرب ترین تنش محیطی است که بیش از هر تنش محیطی دیگری بهره‌وری محصول را کاهش می دهد. پیامدهای اصلی خشکی در گیاهان زراعی کاهش در سرعت تقسیم و گسترش سلولی، اندازه برگ، طول شدن ساقه و تکثیر ریشه و اختلال در نوسانات روزنه، روابط آب و مواد مغذی گیاه با کاهش بهره وری محصول و کارایی مصرف آب است (Farooq et al. 2012). مطالعه ژن‌های مرکزی دارای کاهش بیان نشان می دهد که فتوستنتز به طور قابل توجهی توسط تنش خشکی سرکوب می شود. فتوستنتز یکی از حیاتی ترین فرآیندهای زیستی برای بقای گیاه است که به شدت تحت تأثیر تنش خشکی قرار می گیرد. تحت تنش خشکی میزان جذب  $CO_2$ ، اندازه برگ، گسترش ساقه و تکثیر ریشه کاهش می یابد (Razi and Muneer 2021). در مطالعات دیگری نیز مشخص شده است که در شرایط تنش، ژن‌های مرتبط با تنش، رشد جنینی و فرایند متابولیسم کربوهیدرات افزایش می یابد، در حالی که ژن‌های مربوط به فتوستنتز، تمایز سلولی، فرایند متابولیسم فسفر و فرایند تولید مثل تحت شرایط خشکی در هر دو رقم برنج مورد آزمایش (IRAT109 و ZS97) کاهش می یابد (Ding et al. 2013).



شکل ۸. الگوی بیان ژن پراکسیداز ۴۷، ژن ناشناخته، *homeobox-leucine zipper protein* و *OsDSSR1* در لاین متحمل و حساس برنج ایرانی پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تنش خشکی که لاین متحمل با R و لاین حساس با H نشان داده شده است

Figure 8. Expression pattern of *peroxidase 47* gene and *unknown* gene, *homeobox-leucine zipper protein*, *OsDSSR1* in tolerant and sensitive line of Iranian rice after 24 hours and 48 hours after applying drought stress. The tolerant line is indicated by R and the sensitive line, by H

ژن‌های مرکزی متفاوت بیان شونده دارای افزایش بیان تحت تنش خشکی عمدتاً مربوط به تحمل تنش شامل ژن‌های HSP، LEAs، PP2Cs و فاکتورهای رونویسی bZIP هستند. پروتئین فراوان در اواخر جنین زایی با جلوگیری از تجمع پروتئین در سلول در طول کمبود آب که به سلول اجازه می‌دهد به عملکرد خود ادامه دهد، به تعادل اثرات مضر تنش خشکی کمک می‌کند (Liang et al. 2021). این پروتئین در طی کم آبی، باعث سم‌زدایی و کاهش آسیب‌های سلولی می‌شود. افزایش بیان برخی از ژن‌های کلاس LEA باعث افزایش تحمل کم آبی در گیاهان می‌شود، اما سازوکار اصلی هنوز ناشناخته است (Ali et al. 2017). در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده است که ژن‌های LEA در تنش خشکی در پنبه (Magwanga et al. 2018) و برنج (Wang Xu-Sheng et al. 2007) به شدت بیان می‌شوند. پروتئین‌های شوک حرارتی به پنج گروه عمده تقسیم می‌شوند: small HSPs و chaperonins HSP70، HSP90، HSP100،

می‌دهد. پروتئین‌های تاشونده و تجزیه‌کننده به عنوان چاپرون‌های ملکولی مسئول تاخوردگی، سرهم کردن، جابجایی و تجزیه پروتئین‌ها نقش کلیدی در محافظت گیاهان در قبال تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند (Wang Wangxia et al. 2004). یانگ و همکاران (۲۰۱۴) افزایش تظاهر ژنهای *HSPs* را تحت تنش NaCl در برگ و ریشه گیاه *Tamarix hispida* مشاهده کردند (Yang et al. 2014). کاوثر و همکاران (۲۰۱۳)، بیان نمودند تظاهر پروتئین HSP70 در ارقام جو حساس و متحمل به تنش خشکی را بررسی و کاهش بیان آن را در رقم‌های حساس و افزایش بیان آن را در رقم‌های متحمل مشاهده کردند (Kaeffer et al. 2014). الوارز و همکاران (۲۰۱۴)، سطح بیان بالای پروتئین HSP70 را در کولتیوارهای متحمل گندم در مقایسه با ژنوتیپ‌های حساس تحت تنش خشکی مشاهده کردند (Alvarez et al. 2014). یوشیمورا و همکاران (۲۰۰۸) تظاهر انواع مختلف پروتئین‌های شوک حرارتی نظیر HSP20.1, HSP70, HSP82, and HSP90 تحت تنش خشکی در رقم‌های بومی هندوانه مشاهده شد (Yoshimura et al. 2008).

پروتئین‌های دهیدرین (DHN) در طی تنش خشکی در گیاهان تجمع می‌یابند. این پروتئین‌ها بسیار آبدوست هستند و نقش‌های چندوجهی در حفاظت از سلول‌های گیاهی در شرایط تنش خشکی ایفا می‌کنند. پروتئین‌های DHN با افزایش ظرفیت نگهداری آب، افزایش محتوی کلروفیل، حفظ فتوسنتز، فعال‌سازی سم‌زدایی ROS و تجمع املاح سازگار و غیره در تحمل تنش خشکی نقش ایفا می‌کند (Ali et al. 2017). دهیدرین‌ها بخشی از پروتئین‌های LEA هستند که در پاسخ به اسید آسبازیک ساخته می‌شوند (Bielsa et al. 2016). عوامل رونویسی (TFs) نقش کلیدی در تنظیم فرآیندهای زیستی در سلول‌های گیاهی دارند. هنگامی که گیاهان توسط تنش‌های سرما، گرما، شوری یا خشکی تحریک می‌شوند، یک سری از پیام‌رسان‌ها می‌توانند TFs را وادار کنند تا به طور خاص به عناصر سیس (Cis Elements) متصل شوند و باعث بیان ژن‌های پاسخ به تنش گردند و تحمل تنش در گیاه را بهبود دهند. بیش از ۶۰ خانواده TF در گیاهان شناسایی شده است. یکی از بزرگترین خانواده‌های TF در گیاهان bZIP می‌باشد و نقش تنظیمی حیاتی در رشد و نمو گیاهان، دفاع از آفات، تنش‌های غیرزیستی و سایر فرآیندهای فیزیولوژیکی ایفا می‌کند (Hsieh et al. 2012). در این تحقیق عامل رونویسی bZIP در فهرست ژن‌های با بیان بالا مشخص شده است. مطالعات پیشین نشان داد که *OsZIP23* در مسیر پیام‌رسانی ABA در برنج فعالیت می‌کند و گیاهان تراریخت تحمل بیشتری تحت تنش خشکی نشان می‌دهند (Zong et al. 2016). همچنین مشخص شد *OsZIP71* تحمل به خشکی را در یک مسیر با واسطه ABA در برنج افزایش می‌دهد (Liu et al. 2014). تحت تنش خشکی، ۱۶ ژن *MdbZIP* به طور متفاوت در ریشه و برگ سیب بیان شد که نشان می‌دهد این ژن‌ها با پاسخ به تنش خشکی مرتبط هستند (Li et al. 2016). تنش خشکی باعث افزایش بیان ژن‌های موثر در مسیر پیام‌رسانی هورمون (Le et al. 2012)، افزایش مسیر پیام‌رسانی MAPK در سیب (Haider et al. 2020, Huang et al. 2017) شده است. هم‌چنین مسیرهای تخریب نوکلئوتید پورین و گلوکونوژنز در ریشه و تخریب والین در اندام هوایی تحت تنش خشکی افزایش می‌یابد زیرا اسیدهای آمینه مانند والین، لوسین، ایزولوسین به عنوان پیش ماده‌ای برای سنتز پلی آمین‌ها عمل می‌کنند که همراه با پرولین اثر محافظتی اسمزی هم‌افزایی در برابر تنش خشکی ایجاد می‌کنند و گلوکوزینولات‌ها ترکیبات حاوی نیتروژن و گوگرد هستند که از اسیدهای آمینه مانند والین، لوسین، آلانین به دست می‌آیند. این ترکیبات در پاسخ به تنش خشکی تجمع می‌یابند (Bhardwaj et al. 2013). هم‌چنین تحت تنش خشکی فتوسنتز که مهمترین فرآیند متابولیک برای جذب کربن در گیاهان است کاهش می‌یابد. کاهش تنظیم فتوسنتز پاسخ سازگاری اولیه به تنش خشکی است. کاهش فتوسنتز می‌تواند به دلیل کاهش CO<sub>2</sub> موجود ناشی از بسته شدن روزنه‌ها یا آسیب اکسیداتیو متعاقب آن ناشی از تجمع

ROS تحت تنش کم آبی باشد (Ma et al. 2016). خشکی با مهار رشد و فتوسنتز، بهره‌وری گیاه را کاهش می‌دهد (Waseem et al. 2011). در مرحله آخر برای بررسی درستی ژن‌های متفاوت بیان شده بدست آمده از پژوهش‌های بیوانفورماتیکی، با استفاده از qPCR بر روی ژن‌های *OsDSSR1*, *homeobox-leucine zipper protein* به عنوان ژن‌های دارای افزایش بیان در فراتحلیل و ژن‌های پراکسیداز ۴۷ و یک ژن ناشناخته به عنوان ژن‌های دارای کاهش بیان در فراتحلیل اجرا شد و نتایج حاصل از آزمایش qPCR کاهش بیان و افزایش بیان را در ژن‌های مورد نظر از فراتحلیل تایید کرد.

**نتیجه گیری:** فراتحلیل داده‌های میکروآرای برنج تحت تنش خشکی، ۵۷۸ ژن دارای افزایش بیان، ۶۶۰ ژن دارای کاهش بیان را نشان داد. مطالعه حاضر نشان داد که ژن‌های مرکزی متفاوت بیان شونده دارای افزایش بیان تحت تنش خشکی عمدتاً مربوط به تحمل تنش شامل ژن‌های HSP، LEAs، PP2Cs و فاکتورهای رونویسی bZIP هستند. ژن‌های مرکزی متفاوت بیان شونده دارای کاهش مربوط به فتوسنتز هستند که به طور قابل توجهی توسط تنش خشکی سرکوب می‌شود. شناسایی ژن‌های هاب یا مرکزی در این مطالعه می‌تواند برای به دست آوردن یک نمای کلی از ژن‌های هاب که نقش مهمی در پاسخ به تنش خشکی در برنج دارند، موثر باشد. بنابراین، این یافته‌ها می‌تواند درک مکانیسم‌های پاسخ به تنش خشکی را تسهیل کرده و ژن‌های کاندید را در پایین دست ژن‌های مرکزی در برنامه‌های اصلاحی معرفی کند و با مهندسی ژنتیک مانند انتقال ژن و ویرایش ژنوم، بیان ژن‌های کاندید را افزایش یا کاهش دهد.

**سپاسگزاری:** از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان به خاطر حمایت مالی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود و از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی 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 ESR1 در بز کرکی رابینی 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)، ۱۱۱-۱۲۲.

## References

- Ahuja I, de Vos RC, Bones AM, Hall RD (2010) Plant molecular stress responses face climate change. Trends Plant Sci 15, 664-674.

- Ali F, Bano A, Fazal A (2017) Recent methods of drought stress tolerance in plants. *Plant Growth Regul* 82, 363-375.
- 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).
- Alvarez S, Roy Choudhury S, Pandey S (2014) Comparative quantitative proteomics analysis of the ABA response of roots of drought-sensitive and drought-tolerant wheat varieties identifies proteomic signatures of drought adaptability. *J Proteome Res* 13, 1688-1701.
- Bhattacharjee A, Sharma R, Jain M (2017) Over-expression of OsHOX24 confers enhanced susceptibility to abiotic stresses in transgenic rice via modulating stress-responsive gene expression. *Front Plant Sci* 8, 628.
- Bhardwaj J, Chauhan R, Swarnkar MK et al. (2013) Comprehensive transcriptomic study on horse gram (*Macrotyloma uniflorum*): De novo assembly, functional characterization and comparative analysis in relation to drought stress. *BMC Genom* 14, 1-18.
- Bielsa B, Leida C, Rubio-Cabetas MJ (2016) Physiological characterization of drought stress response and expression of two transcription factors and two LEA genes in three *Prunus* genotypes. *Sci Hortic* 213, 260-269.
- Chin C-H, Chen S-H, Wu H-H et al. (2014) cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Syst Biol* 8, 1-7.
- Devi KU, Sridevi V, Mohan CM et al. (2005) Effect of high temperature and water stress on in vitro germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *J Invertebr Pathol* 88, 181-189.
- Ding X, Li X, Xiong L (2013) Insight into differential responses of upland and paddy rice to drought stress by comparative expression profiling analysis. *Int J Mol Sci* 14, 5214-5238.
- Farooq M, Hussain M, Wahid A, Siddique K (2012) Drought stress in plants: an overview. Springer. E Yu pp. 1-33.
- Gao W, Zhang Y, Feng Z et al. (2018) Effects of melatonin on antioxidant capacity in naked oat seedlings under drought stress. *Mol* 23, 1580.
- González-Gordo S, Bautista R, Claros MG et al. (2019) Nitric oxide-dependent regulation of sweet pepper fruit ripening. *J Exp Bot* 70, 4557-4570.
- Grennan AK (2006) Abiotic stress in rice. An “omic” approach. *Plant Physiol* 140, 1139-1141.

- Haider MS, Kurjogi MM, Khalil-Ur-Rehman M et al. (2017) Grapevine immune signaling network in response to drought stress as revealed by transcriptomic analysis. *Plant Physiol Biochem* 121, 187-195.
- Hsieh W-P, Hsieh H-L, Wu S-H (2012) Arabidopsis bZIP16 transcription factor integrates light and hormone signaling pathways to regulate early seedling development. *Plant Cell* 24, 3997-4011.
- Huang D, Ma M, Wang Q et al. (2020) Arbuscular mycorrhizal fungi enhanced drought resistance in apple by regulating genes in the MAPK pathway. *Plant Physiol Biochem* 149, 245-255.
- Jangam AP, Pathak RR, Raghuram N (2016) Microarray analysis of rice d1 (RGA1) mutant reveals the potential role of G-protein alpha subunit in regulating multiple abiotic stresses such as drought, salinity, heat, and cold. *Front Plant Sci* 7, 11.
- Ji Y, Tu P, Wang K et al. (2014) Defining reference genes for quantitative real-time PCR analysis of anther development in rice. *ABBS* 46, 305-312.
- Kaever A, Landesfeind M, Feussner K et al. (2014) Meta-analysis of pathway enrichment: combining independent and dependent omics data sets. *PloS one* 9, e89297.
- Karaba A, Dixit S, Greco R et al. (2007) Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an Arabidopsis drought and salt tolerance gene. *Proc Natl Acad Sci* 104, 15270-15275.
- Kim D-W, Shibato J, Agrawal GK et al. (2007) Gene transcription in the leaves of rice undergoing salt-induced morphological changes (*Oryza sativa* L.). *Mol Cells* 24, 45-49
- Le DT, Nishiyama R, Watanabe Y et al. (2012) Differential gene expression in soybean leaf tissues at late developmental stages under drought stress revealed by genome-wide transcriptome analysis. *PloS one* 7, e49522.
- Li Y-Y, Meng D, Li M, Cheng L (2016) Genome-wide identification and expression analysis of the bZIP gene family in apple (*Malus domestica*). *Tree Genet Genomes* 12, 1-17.
- Liang Y, Tabien RE, Tarpley L et al. (2021) Transcriptome profiling of two rice genotypes under mild field drought stress during grain-filling stage. *AoB Plants* 13: plab043.
- Liu C, Mao B, Ou S et al. (2014) OsbZIP71, a bZIP transcription factor, confers salinity and drought tolerance in rice. *Plant Mol Biol* 84, 19-36.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> ΔΔCT method. *Methods* 25, 402-408.



- Ma X, Xia H, Liu Y et al. (2016) Transcriptomic and metabolomic studies disclose key metabolism pathways contributing to well-maintained photosynthesis under the drought and the consequent drought-tolerance in rice. *Front Plant Sci* 7, 1886.
- Magwanga RO, Lu P, Kirungu JN, Lu H et al. (2018) Characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) proteins family and their role in drought stress tolerance in upland cotton. *BMC Genet* 19, 1-31.
- Masoudzadeh SH, Mohammadabadi MR, Khezri A, et al. (2020) Dlk1 gene expression in different Tissues of lamb. *Iran J Appl Anim Sci* 10 (4), 669-677.
- 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).
- Safaei SMH, Dadpasand M, Mohammadabadi M, et al. (2022) An *Origanum majorana* Leaf Diet Influences Myogenin Gene Expression, Performance, and Carcass Characteristics in Lambs. *Animals* 13 (1), e14.
- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA et al. (2003) Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol* 133, 1755-1767.
- Ransbotyn V, Yeger-Lotem E, Basha O et al. (2015). A combination of gene expression ranking and co-expression network analysis increases discovery rate in large-scale mutant screens for novel *Arabidopsis thaliana* abiotic stress genes. *Plant Biotechnol J* 13, 501-513.
- Razi K, Muneer S (2021) Drought stress-induced physiological mechanisms, signaling pathways and molecular response of chloroplasts in common vegetable crops. *Crit Rev Biotechnol* 1-40.

- Safaei SMH, Dadpasand M, Mohammadabadi M, et al. (2022) An *Origanum majorana* Leaf Diet Influences Myogenin Gene Expression, Performance, and Carcass Characteristics in Lambs. *Animals* 13 (1), e14.
- 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, 111.
- Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2022) Effect of Fennel (*Foeniculum Vulgare*) Seed Powder Consumption on Insulin-like Growth Factor 1 Gene Expression in the Liver Tissue of Growing Lambs. *Gene Expr* 21 (2), 21-26.
- Sharma R, Singh G, Bhattacharya S, Singh A (2018) Comparative transcriptome meta-analysis of *Arabidopsis thaliana* under drought and cold stress. *PloS one* 13, e0203266.
- Sharma M, Singh A, Shankar A et al. (2014) Comprehensive expression analysis of rice Armadillo gene family during abiotic stress and development. *DNA Res* 21, 267-283.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot* 58, 221-227.
- Tseng GC, Ghosh D, Feingold E (2012) Comprehensive literature review and statistical considerations for microarray meta-analysis. *Nucleic Acids Res* 40, 3785-3799.
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci* 9, 244-252.
- Wang X-S, Zhu H-B, Jin G-L et al. (2007) Genome-scale identification and analysis of LEA genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci* 172, 414-420.
- Waseem M, Ali A, Tahir M et al. (2011) Mechanism of drought tolerance in plant and its management through different methods. *CJAgricSci* 5, 10-25.
- Xu K, Chen S, Li T et al. (2021) Overexpression of OsHMGB707, a high mobility group protein, enhances rice drought tolerance by promoting stress-related gene expression. *Front Plant Sci* 12, 711271.
- Yang G, Wang Y, Zhang K, Gao C (2014) Expression analysis of nine small heat shock protein genes from *Tamarix hispida* in response to different abiotic stresses and abscisic acid treatment. *Mol Biol Rep* 41, 1279-1289.
- Yoshimura K, Masuda A, Kuwano M et al. (2008) Programmed proteome response for drought avoidance/tolerance in the root of a C3 xerophyte (wild watermelon) under water deficits. *Plant Cell Physiol* 49, 226-241.
- Zong W, Tang N, Yang J et al. (2016) Feedback regulation of ABA signaling and biosynthesis by a bZIP transcription factor targets drought-resistance-related genes. *Plant Physiol* 171, 2810-2825.