

مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۸، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۴

شاپای چاپی: ۰۶۳۲ - ۲۷۱۷، شاپای الکترونیکی: ۹۸۰۴ - ۲۷۱۶

تحلیل یکپارچه فیزیولوژی و ترنسکریپتوم برای شناسایی سازوکارهای تحمل خشکی در پنبه (*Gossypium* spp.): استفاده از داده های امیکس در مسیر توسعه پایدار کشاورزی

نوع مقاله: پژوهشی

یدالله دالوند^۱، مجتبی خیام نکوئی^{۲*}، عبدالرضا جعفری^{۳*}، رسمیه حمید^۳، محمدرضا
غفاری^{۵،۴}

۱. گروه ژنتیک مولکولی، واحد ارسنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، ارسنجان، ایران

۲. گروه علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳. گروه تحقیقات اصلاح نباتات، موسسه تحقیقات پنبه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گلستان، ایران

۴. گروه تحقیقات بیوانفورماتیک و هوش مصنوعی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۵. گروه تحقیقات زیست شناسی سامانه ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

mojtabakhayam@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۴/۰۵، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۶/۰۵

صفحه ۹۴-۱۱۶

چکیده

تنش خشکی از مهم ترین عوامل محدودکننده عملکرد پنبه در مناطق خشک و نیمه خشک است. در این مطالعه، پاسخ دو ژنوتیپ حساس (GISV-328) و متحمل (G. Cot 16) با استفاده از داده های فنوتیپی، فیزیولوژی و ترنسکریپتوم بررسی شد. ژنوتیپ متحمل در شرایط کم آبی توانایی بیشتری در حفظ وضعیت آبی، پایداری غشا، کارایی فتوسنتز و تنظیم اسمزی داشت، در حالی که ژنوتیپ حساس آسیب اکسیداتیو بیشتری نشان داد. تحلیل RNA-Seq، ۱۴۶۵ ژن با بیان تفاضلی را شناسایی کرد که در مسیرهای انتقال پیام هورمونی (به ویژه ABA)، سیگنالینگ MAPK، متابولیسم اسیدهای آمینه و کربوهیدرات ها، بیوسنتز متابولیت های ثانویه و پاسخ های آنتی اکسیدانی غنی بودند. افزایش بیان فاکتورهای رونویسی NAC، WRKY، bHLH و DREB و نیز ژن های مرتبط با پروتئین های شوک حرارتی و گروه LEA مشاهده شد که نشان دهنده شبکه های تنظیمی پیچیده است. در ژنوتیپ متحمل، فعال سازی قوی تر مسیرهای تنظیم اسمزی، دفاع آنتی اکسیدانی و متابولیسم انرژی دیده شد، در حالی که ژنوتیپ حساس پاسخ های محدودتری نشان داد. همگرایی سیگنال های کلسیم، ABA و ROS به عنوان محور اصلی تنظیم پاسخ به خشکی شناسایی شد. به طور کلی، تحمل خشکی در پنبه نتیجه تعامل هماهنگ مسیرهای سیگنالینگ، تنظیم رونویسی و سازوکارهای متابولیکی است که هموستازی سلولی را حفظ و سازگاری را افزایش می دهد.

واژه های کلیدی: پنبه، ترنسکریپتوم، تنش خشکی، سیگنالینگ هورمونی، فاکتورهای رونویسی

مقدمه

پنبه (*Gossypium hirsutum*) به عنوان مهم ترین منبع الیاف طبیعی، در بیش از ۳۰ کشور جهان از جمله چین، هند، ایالات متحده آمریکا و پاکستان به عنوان یک محصول تجاری عمده کشت می شود (Ullah et al., 2017). اگرچه پنبه یک گیاه گلکوفیت محسوب می شود، اما در مقایسه با بسیاری از محصولات زراعی مهم، تحمل بالاتری نسبت به تنش های خشکی و شوری از خود نشان می دهد (Feng et al., 2026). با این حال، در شرایط تغییرات اقلیمی جهانی، تخریب محیط زیست و بروز تنش های شدید محیطی، تنش خشکی می تواند به طور قابل توجهی رشد، عملکرد و کیفیت الیاف پنبه را تحت تأثیر قرار دهد (Yu et al., 2016; Zafar et al., 2023; Hamid et al., 2026). تنش خشکی طیف وسیعی از فرایندهای گیاهی از جمله رشد برگ و ریشه، تعرق، فتوسنتز و توسعه زایشی را مختل می کند (Flexas et al., 2012). همچنین این تنش بر فرایندهای فیزیولوژی پایه مانند تقسیم سلولی، هیدرولیک گیاه، مکانیک دیواره سلولی، متابولیسم اولیه و ثانویه و همچنین فرآیند سم زدایی گونه های فعال اکسیژن اثرگذار است (Todaka et al., 2017).

گیاهان برای مقابله با تنش خشکی، مجموعه ای از سازوکارهای مورفولوژی، فیزیولوژی، مولکولی و بیوشیمیایی را به منظور افزایش جذب آب، جلوگیری از اتلاف آب، تأمین متعادل آب برای اندام های حیاتی و در نهایت بقا در شرایط کم آبی تکامل داده اند. این پاسخ ها شامل شبکه های پیچیده ای از ادراک سیگنال خشکی، انتقال پیام، تنظیم بیان ژن و تغییرات متابولیکی نهایی برای مقابله با تنش هستند (Qiao et al., 2024; Ghorbanzadeh et al., 2025). در مواجهه با کم آبی، گیاهان با افزایش جذب آب از طریق ریشه، کاهش تعرق از طریق بسته شدن روزنه ها و تنظیم فرآیندهای اسمزی در بافت ها، تعادل آبی

خود را حفظ می کنند (Chen et al., 2017; Rodrigues et al., 2019).

در سطح سلولی، سیگنال های خشکی موجب افزایش تولید متابولیت های محافظتی مانند پرولین و ترهالوز می شوند، همچنین سیستم آنتی اکسیدانی را برای حذف گونه های فعال اکسیژن (ROS) فعال کرده و آنزیم های پراکسیداز را برای جلوگیری از آسیب های شدید سلولی و حفظ یکپارچگی غشا به کار می گیرند. علاوه بر این، مولکول های پیام رسان مهمی مانند اسید آبسزیک (ABA)، کلسیم (Ca^{2+})، اینوزیتول فسفات و ROS نیز فعال می شوند (Hamid et al., 2024) و در ادامه مسیرهای پیام رسانی تنش خشکی مانند انتقال پیام هورمونی، مسیر MAPK و مسیر سیگنال دهی کلسیم را فعال می کنند (Panahi and Hamid, 2025). در همین راستا، تعداد زیادی ژن و شبکه های تعاملی آن ها در گیاهان مدل شناسایی شده اند (Hua et al., 2012; Su et al., 2013). علاوه بر شبکه های پیچیده تنظیم ژن، گیاهان دارای شبکه های متابولیکی چندلایه و به شدت تنظیم شده ای هستند که نقش کلیدی در رشد آن ها تحت تنش خشکی دارند. در شرایط تنش طولانی مدت، گیاه از طریق تنظیم مسیرهای متابولیکی دقیق تر مانند متابولیسم اسیدهای آمینه، لیپیدها، کربوهیدرات ها و متابولیت های ثانویه، توانایی تحمل تنش را افزایش می دهد. این فرآیندها با فعال سازی سیستم های آنتی اکسیدانی به حفظ هموستازی ردوکس کمک کرده و از طریق آنزیم های پراکسیداز، از آسیب شدید سلولی و تخریب یکپارچگی غشا جلوگیری می کنند (Gupta et al., 2020).

اوسمولیت های رایج در گیاهان شامل قندهای محلول مانند گلوکز، ساکارز، ترهالوز، رافینوز و استاکیوز (Gechev et al., 2013)، پلی آل ها مانند مانیتول و سوربیتول (Bowne et al., 2012)، اسیدهای آمینه و متابولیت های مشابه مانند

"دالوند و همکاران، عنوان: تحلیل یکپارچه فیزیولوژی و ترنسکریپتوم برای شناسایی سازوکارهای تحمل ..."

مبنایی نظری برای جداسازی، شناسایی و بهره‌برداری از ژن‌های مرتبط با مقاومت به تنش در پنبه و سایر محصولات زراعی بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمارهای تنش خشکی

دو ژنوتیپ GISV-328 (حساس به خشکی) و G. Cot.16 (متحمل به خشکی) در گلدان‌هایی با ابعاد 18×30 سانتی‌متر (قطر $\times$ ارتفاع) در شرایط گلخانه‌ای کشت شدند و سه بار در هفته آبیاری شدند تا رطوبت نسبی خاک در حدود ۳۰ درصد حفظ شود. تنش خشکی با قطع آبیاری در مرحله گلدهی و تشکیل غوزه به مدت ۷ روز اعمال شد، در حالی که گیاهان شاهد به صورت معمول آبیاری شدند. رطوبت نسبی خاک با استفاده از حسگر TDR 300 (Spectrum Technologies, Inc., Plainfield, IL, USA) پایش شد و در پایان دوره تنش، این مقدار به حدود ۱۰ درصد در تیمار خشکی و حدود ۳۰ درصد در تیمار شاهد رسید. نمونه‌های ریشه و برگ در سه تکرار زیستی برای انجام تحلیل‌های ترنسکریپتوم و پروفایل متابولیتی جمع‌آوری شدند. شاخص‌های فیزیولوژی با استفاده از برگ‌های عملکردی (چهارمین برگ از رأس ساقه اصلی در ساعات صبح (۱۰:۳۰ تا ۱۲:۳۰) و در روزهای آفتابی متوالی اندازه‌گیری شد (Evans and Santiago, 2014). پس از انجام اندازه‌گیری‌های فیزیولوژیک، اندام هوایی گیاهان برداشت شد.

تحلیل‌های فیزیولوژی و بیوشیمیایی

به منظور ارزیابی اثر تنش خشکی بر ویژگی‌های فیزیولوژی و بیوشیمیایی، برگ چهارم (برگ عملکردی) از گیاهان هر دو ژنوتیپ در سه وضعیت آبی شامل شرایط شاهد، تنش خشکی و بازآبیاری،

پرولین (Todaka *et al.*, 2017) و پلی‌آمین‌ها مانند پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین (Sengupta *et al.*, 2016) هستند. این ترکیبات با تنظیم اسمزی موجب حفظ تورژسانس سلولی، پایدارسازی آنزیم‌ها و کاهش سطح ROS شده و به حفظ تعادل ردوکس سلولی کمک می‌کنند. مطالعات نشان داده‌اند که تحت تنش خشکی، سطح بسیاری از اسیدهای آمینه و ترکیبات مرتبط با آن‌ها از جمله فنیل‌آلانین، پرولین، لیزین، متیونین، آلانین، گلیسین، ترئونین، اورنیتین، ایزولوسین، والین، آرژنین، گلوتامین و سرین افزایش می‌یابد (Skirycz *et al.*, 2010; Tadaka *et al.*, 2017).

یکی از پرسش‌های اساسی در این زمینه، تفکیک رویدادهای اولیه سازگاری با کمبود آب از پیامدهای ثانویه و بلندمدت آن‌ها است. رویکردهای آمیکس ابزارهای قدرتمندی برای تحلیل توالی رویدادهای مولکولی در پاسخ به تنش خشکی فراهم می‌کنند. متابولومیکس، به عنوان روشی برای شناسایی بدون سوگیری سطح متابولیت‌ها در ژنوتیپ‌های مختلف یا در مراحل رشد و پاسخ به تنش، در گونه‌های متعددی از گیاهان از جمله آرابیدوپسیس، گوجه‌فرنگی، برنج و تنباکو مورد استفاده قرار گرفته است (Baharum and Azizan 2018; Zhu *et al.*, 2018). علاوه بر این، پروفایلینگ متابولیتی می‌تواند با سایر فناوری‌های آمیکس ترکیب شود تا تصویری جامع از سطح ژنوم تا متابولوم ارائه دهد. با توجه به اینکه مکانیسم‌های مولکولی مقاومت به تنش‌های غیرزیستی در پنبه هنوز به طور کامل شناخته نشده‌اند، در پژوهش حاضر، به منظور شناسایی سازوکارهای مولکولی تحمل خشکی در پنبه، ترنسکریپتوم کامل دو رقم آستانه‌ای G. Cot.16 متحمل به خشکی و حساس به خشکی GISV-328، تحت شرایط تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفت. هدف این مطالعه، شناسایی ژن‌های کاندیدای مرتبط با تحمل خشکی و فراهم کردن

فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX)

فعالیت APX با روش اسپکتروفتومتری بر پایه اکسیداسیون آسکوربات اندازه گیری شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با pH 7، آسکوربات ۰/۵ میلی مولار، H_2O_2 با غلظت ۰/۱ مولار و ۱۵۰ میکرولیتر عصاره فیتوشیمیایی بود. کاهش جذب آسکوربات در مدت یک دقیقه در طول موج ۲۹۰ نانومتر ثبت شد. غلظت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon = 2.8 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) و رابطه $A = \epsilon bc$ محاسبه شد. فعالیت آنزیم بر اساس واحد فیتوشیمیایی به ازای میزان پروتئین موجود در ۵۰ میکرولیتر عصاره (بر اساس روش برادفورد) بیان شد. یک واحد APX مقدار ماده فیتوشیمیایی است که یک میلی مول آسید آسکوربیک را در یک دقیقه اکسید می کند.

فعالیت کاتالاز

فعالیت CAT به روش اسپکتروفتومتری و بر اساس کاهش جذب H_2O_2 طی ۳۰ ثانیه در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با pH 7، محلول H_2O_2 با غلظت ۱۵ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره فیتوشیمیایی بود. واکنش با افزودن H_2O_2 آغاز شد و کاهش جذب ثبت شد. غلظت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon = 0.28 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) و رابطه $A = \epsilon bc$ محاسبه شد. فعالیت آنزیم به صورت واحد فیتوشیمیایی بر اساس مقدار پروتئین در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره بیان شد. یک واحد CAT مقدار ماده فیتوشیمیایی است که یک میلی مول H_2O_2 را در یک دقیقه تجزیه می کند.

اندازه گیری مالون دی آلدئید (MDA)

برای سنجش MDA، مقدار ۰/۲۵ گرم برگ با ۵ میلی لیتر محلول ۰/۱ درصد TCA همگن سازی و سانتریفیوژ شد. به میزان ۲۵۰ میکرولیتر از

به صورت تصادفی انتخاب شد و برای اندازه گیری شاخص های مورد نظر مورد استفاده قرار گرفت.

در این مطالعه، محتوای نسبی آب برگ (Relative Water Content, RWC)، پتانسیل اسمزی (Osmotic Potentia, OP)، نشت الکترولیتی (Electrolytic Leakage, EL)، میزان تجمع پرولین بر و محتوای کلروفیل کل مطابق روش های مرسوم اندازه گیری شد (Barrs and Weatherley 1962; Hiscox and Israelstam 1979; Wang *et al.*, 2008; Bhauso *et al.*, 2014). علاوه بر این، به منظور بررسی ظرفیت دفاع آنتی اکسیدانی گیاه، فعالیت آنزیم های کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و پراکسیداز (POX) مطابق ذیل اندازه گیری شد. تمامی اندازه گیری ها با استفاده از سه تکرار زیستی مستقل انجام شد و میانگین مقادیر حاصل برای تحلیل های آماری مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه عصاره فیتوشیمیایی

برای تهیه ۵۰ میلی لیتر بافر استخراج، مقدار ۰/۶۰۷ گرم تی ریس و ۰/۰۵ گرم پلی وینیل پیرولیدون (PVP) در ۴۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. اسیدیته محلول با استفاده از اسید کلریک به ۸ تنظیم گردید و حجم نهایی به ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. برای استخراج پروتئین و ترکیبات فیتوشیمیایی، ۰/۵ گرم نمونه برگ با نیتروژن مایع به پودر تبدیل شد. سپس ۲ میلی لیتر از بافر تهیه شده به نمونه اضافه و همگن سازی انجام شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و سوپرناتانت برای اندازه گیری میزان پروتئین و فعالیت فیتوشیمیایی جدا شد. این روش امکان استخراج کارآمد نمونه ها برای تحلیل های بیوشیمیایی بعدی را فراهم کرد (Bradford, 1976).

"دالوند و همکاران، عنوان: تحلیل یکپارچه فیزیولوژی و ترنسکریپتوم برای شناسایی سازوکارهای تحمل ..."

استخراج آران و توالی‌یابی

آران کل از نمونه‌های شاهد و تیمار با استفاده از کیت Xcelgen Plant RNA Kit ساخت کشور هند مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. خلوص و کیفیت آران استخراج‌شده با استفاده از دستگاه NanoDrop ND-1000 UV/Vis (Thermo Scientific, Wilmington, DE) Spectrophotometer و همچنین یکپارچگی (RNA integrity number, RIN) آن با استفاده از سیستم Agilent 2100 (Agilent Technologies) Bioanalyzer ارزیابی شد.

نمونه‌های آران با کیفیت بالا برای تهیه کتابخانه‌های جفت‌انتهایی (paired-end libraries) به کار گرفته شدند. کتابخانه‌های توالی‌یابی با استفاده از کیت Illumina TruSeq Stranded Total RNA Library Construction Kit کشور آمریکا تهیه شدند و میانگین اندازه هر کتابخانه حدود ۳۲۰ جفت‌باز بود. کتابخانه‌ها با استفاده از ۱ میکروگرم آران کل و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده ساخته شدند. در فرآیند ساخت کتابخانه، ابتدا حذف rRNA با استفاده از bead های مخصوص انجام شد. سپس آران به cDNA تبدیل گردید؛ در ادامه مراحل A-tailing، اتصال آداپتورهای ایندکس (adapter/index ligation) و تکثیر PCR انجام گرفت. در نهایت، کنترل کیفیت و تعیین کمیت کتابخانه‌ها با استفاده از سیستم Agilent 2100 Bioanalyzer و چیپ دی‌ان‌ا با حساسیت بالا (High Sensitivity DNA chip) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

کمی‌سازی سطح بیان ژن و تحلیل بیان تفاضلی

به منظور افزایش کیفیت داده‌های توالی‌یابی، ابتدا توالی‌های آداپتور و خوانش‌های دارای کیفیت پایین با استفاده از نرم‌افزار Fastp نسخه ۰.۲۱.۰ با

سوپرناتانت با ۱ میلی‌لیتر محلول حاوی ۲۰ درصد TCA و ۰/۵ درصد TBA مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس نمونه خنک و مجدداً سانتریفیوژ شد. جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری و جذب غیرتخصصی در ۶۰۰ نانومتر از آن کم شد. محتوای MDA با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Heath and Parker, 1968).

$$\text{MDA } (\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}) = \frac{(A532 - A600) \times W}{116 \times 1000}$$

که در آن:

A532=جذب خوانده‌شده در ۵۳۲ نانومتر

A600=جذب خوانده‌شده در ۶۰۰ نانومتر

W=وزن نمونه برگ

اندازه‌گیری پرولین

برای اندازه‌گیری پرولین، مقدار ۰/۵ گرم برگ با ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۳ درصد سولفوسالسیلیک اسید مخلوط، همگن و صاف شد. ۲ میلی‌لیتر از محلول صاف‌شده با ۲ میلی‌لیتر معرف نینهیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک مخلوط و به مدت یک ساعت در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد؛ سپس سریعاً سرد شد. پس از افزودن ۶ میلی‌لیتر تولوئن و تکان شدید، فاز بالایی جدا و جذب آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوای پرولین با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{Proline } (\mu\text{M g}^{-1} \text{fresh wt}) = \frac{M \times T \times W}{115.5 \times 1000}$$

که:

M=مقدار خوانده‌شده توسط اسپکتروفتومتر

T=حجم تولوئن (۴ میلی‌لیتر)

W=وزن نمونه تازه برگ

دخیل در مسیرهای زیستی، فرایندهای متابولیکی و شبکه‌های تنظیمی مرتبط با پاسخ پنبه به تنش خشکی را فراهم کرد.

آنالیز هستی‌شناسی

برای تحلیل غنی‌سازی عملکردی ژن‌های دارای بیان تفاضلی، بسته نرم‌افزاری (clusterProfiler) نسخه ۴ مورد استفاده قرار گرفت و ژن‌ها بر اساس سه رده اصلی هستی‌شناسی ژن شامل فرایندهای زیستی (Biological Process)، عملکردهای مولکولی (Molecular Function) و اجزای سلولی (Cellular Component) طبقه‌بندی شدند. همچنین برای شناسایی اصطلاحات و مسیرهای به‌طور معنی‌دار غنی‌شده در مقایسه با پس‌زمینه ژنومی، از آزمون فراهندسی (Hypergeometric Test) در سطح ۵ درصد استفاده شد. تحلیل غنی‌سازی GO و مسیرهای KEGG برای mRNAهای دارای بیان تفاضلی با استفاده از پایگاه DAVID (نسخه ۶.۸) انجام گرفت. نتایج حاصل از تحلیل‌های غنی‌سازی به‌صورت نمودار میله‌ای، نمودار حبابی و سایر نمایش‌های گرافیکی ارائه شدند.

تحلیل آماری

تمام اندازه‌گیری‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی با استفاده از سه تکرار زیستی مستقل انجام شد و نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (SD) ارائه شدند. داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون Tukey انجام شد. سطح $P < 0.01$ به عنوان سطح معنی‌داری آماری در نظر گرفته شد.

پارامترهای پیش‌فرض حذف شدند تا مجموعه‌ای از خوانش‌های پاک (Clean Reads) برای تحلیل‌های بعدی فراهم شود (Chen *et al.*, 2017). در ادامه، خوانش‌های پالایش‌شده به ژنوم مرجع *G. hirsutum* رقم TM-1 (assembly v2.0) (annotation a2.1) هم‌تراز شدند. این مرحله با استفاده از نرم‌افزار HISAT2 انجام گرفت که به دلیل سرعت بالا و دقت مناسب در هم‌ترازی داده‌های RNA-Seq، یکی از پرکاربردترین ابزارهای تحلیل ترنسکریپتوم محسوب می‌شود (Kim *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019). فایل‌های حاصل از هم‌ترازی برای تعیین موقعیت ژنومی هر خوانش و برآورد میزان بیان ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. برای کمی‌سازی سطح بیان ژن‌ها و رونوشت‌ها، از شاخص FPKM (تعداد قطعات هم‌تراز شده به ازای هر کیلوباز طول رونوشت در هر میلیون خوانش هم‌تراز شده) استفاده شد. این شاخص با نرمال‌سازی اثر طول ژن و عمق توالی‌یابی، امکان مقایسه میزان بیان ژن‌ها را بین نمونه‌های مختلف فراهم می‌کند.

به‌منظور شناسایی ژن‌های دارای بیان تفاضلی، ابتدا تعداد خوانش‌های منتسب به هر ژن استخراج شد و سپس تحلیل آماری بر اساس داده‌های خام شمارشی با استفاده از بسته DESeq2 انجام گرفت (Varet *et al.*, 2016). در این مطالعه، ژن‌هایی که دارای مقدار $|\log_2 \text{Fold Change}| \geq 1$ و نرخ کشف خطای تعدیل‌شده (False discovery rate, FDR) کمتر از ۵ درصد بودند، به‌عنوان ژن‌های دارای بیان تفاضلی (Differentially Expressed Genes; DEGs) در نظر گرفته شدند. در نهایت، به‌منظور تعیین عملکرد احتمالی ژن‌های شناسایی‌شده، فرآیند حاشیه‌نویسی عملکردی (Functional Annotation) با استفاده از هم‌تاسازی توالی‌ها با پایگاه داده پروتئینی *Arabidopsis thaliana* و همچنین پایگاه داده غیرتکراری NCBI (NR) انجام شد. این مرحله امکان شناسایی ژن‌های

"دالوند و همکاران، عنوان: تحلیل یکپارچه فیزیولوژی و ترنسکریپتوم برای شناسایی سازوکارهای تحمل ..."

نتایج

سازوکارهای فیزیولوژی مؤثر در تحمل خشکی

در پنبه

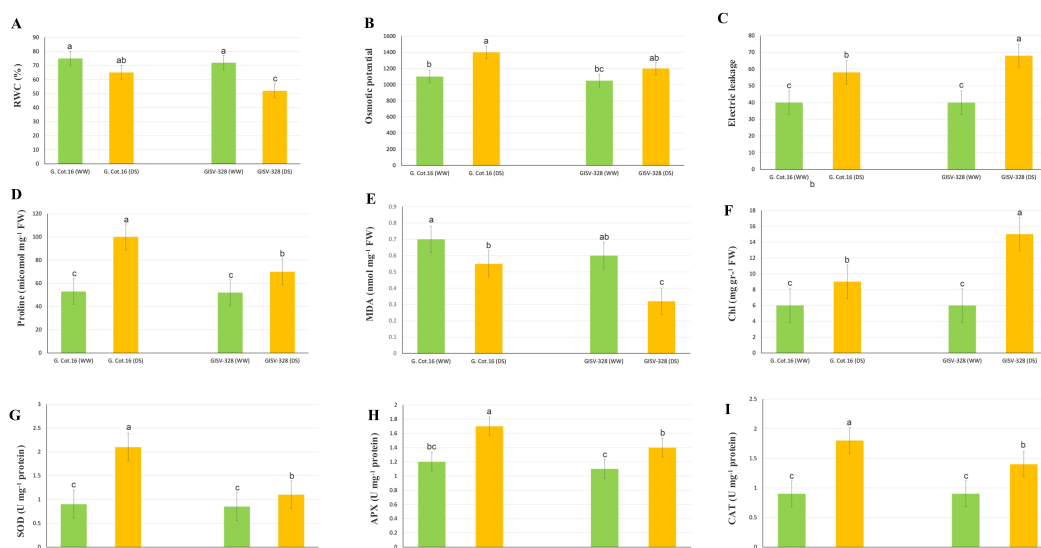
به منظور ارزیابی پاسخ فیزیولوژی و بیوشیمیایی دو ژنوتیپ پنبه شامل GISV-328 (حساس به خشکی) و G. Cot.16 (متحمل به خشکی) به تنش کم آبی، مجموعه‌ای از شاخص‌های شامل محتوای نسبی آب برگ، پتانسیل اسمزی، نشت الکترولیتی، محتوای پرولین، مالون‌دی‌آلدئید، کلروفیل کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در شرایط آبیاری مطلوب (WW) و تنش خشکی (DS) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان داد که تنش خشکی موجب کاهش معنی‌دار محتوای نسبی آب برگ در هر دو ژنوتیپ شد، اما شدت این کاهش در ژنوتیپ متحمل کمتر بود. مقدار RWC در ژنوتیپ G. Cot.16 از ۷۵٪ در شرایط شاهد به ۶۵٪ در شرایط تنش کاهش یافت، در حالی که در ژنوتیپ GISV-328 این شاخص از ۷۲٪ به ۵۲٪ رسید (شکل ۲a) حفظ بهتر وضعیت آبی در G. Cot.16 نشان‌دهنده توانایی بیشتر این ژنوتیپ در جذب، انتقال و نگهداری آب تحت شرایط کمبود رطوبت است. بررسی پتانسیل اسمزی نیز نشان داد که تنش خشکی موجب افزایش این شاخص در هر دو ژنوتیپ شد، اما میزان افزایش در ژنوتیپ متحمل بیشتر بود. پتانسیل اسمزی در G. Cot.16 از ۱۱۰۰ به ۱۴۰۰ mmol kg^{-1} و در GISV-328 از ۱۰۵۰ به ۱۲۰۰ mmol kg^{-1} افزایش یافت. این افزایش بیانگر تجمع بیشتر ترکیبات محلول سازگارکننده (compatible solutes) و توانایی بالاتر ژنوتیپ متحمل در تنظیم اسمزی و حفظ تورژسانس سلولی در شرایط خشکی است. نشت الکترولیتی به عنوان شاخصی از پایداری غشاهای سلولی، در پاسخ به تنش خشکی در هر دو ژنوتیپ افزایش یافت. با این حال، میزان نشت الکترولیتی در

ژنوتیپ حساس بیشتر بود؛ به طوری که این شاخص در G. Cot.16 از ۴۰٪ به ۵۸٪ و در GISV-328 از ۴۰٪ به ۶۸٪ افزایش یافت. این نتایج نشان می‌دهد که غشاهای سلولی ژنوتیپ متحمل در برابر آسیب‌های ناشی از تنش خشکی پایداری بیشتری دارند. یکی از مهم‌ترین پاسخ‌های مشاهده شده در برابر تنش خشکی، افزایش تجمع پرولین بود. مقدار پرولین در ژنوتیپ متحمل از ۵۳ به $100 \mu\text{g g}^{-1} \text{FW}$ و در ژنوتیپ حساس از ۵۲ به $70 \mu\text{g g}^{-1} \text{FW}$ افزایش یافت. تجمع بیشتر پرولین در G. Cot.16 نشان‌دهنده نقش مؤثر این اسمولیت در تنظیم اسمزی، حفاظت از ساختارهای سلولی و کاهش آسیب‌های ناشی از تنش کم آبی است. غلظت مالون‌دی‌آلدئید که شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب اکسیداتیو غشاهای سلولی محسوب می‌شود، در هر دو ژنوتیپ تحت تنش افزایش یافت، اما شدت این افزایش در ژنوتیپ حساس بیشتر بود. مقدار MDA در G. Cot.16 از ۶ به ۹ و در GISV-328 از ۶ به ۱۵ افزایش یافت. این نتایج نشان می‌دهد که ژنوتیپ حساس در معرض آسیب اکسیداتیو شدیدتری قرار گرفته است. تنش خشکی همچنین موجب کاهش محتوای کلروفیل در هر دو ژنوتیپ شد. با این حال، ژنوتیپ متحمل توانایی بیشتری در حفظ رنگیزه‌های فتوسنتزی داشت. مقدار کلروفیل کل در G. Cot.16 از ۷۰٪ به ۵۵٪ mg g^{-1} و در GISV-328 از ۶۰٪ به ۳۲٪ $\text{mg g}^{-1} \text{FW}$ کاهش یافت. حفظ بیشتر کلروفیل در ژنوتیپ متحمل می‌تواند به تداوم فعالیت فتوسنتزی و تولید ماده خشک در شرایط تنش کمک کند. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نیز در پاسخ به تنش خشکی افزایش یافت. فعالیت آنزیم SOD در G. Cot.16 از ۹۰٪ به $2/10 \text{ U mg}^{-1} \text{protein}$ و در GISV-328 از ۸۵٪ به $1/10$ افزایش یافت. به طور مشابه، فعالیت APX در ژنوتیپ متحمل از $1/20$ به $1/70 \text{ U mg}^{-1} \text{protein}$ و در ژنوتیپ حساس از

نشان داد که ژنوتیپ G. Cot.16 در مقایسه با GISV-328 از ظرفیت بیشتری برای حفظ وضعیت آبی، تنظیم اسمزی، پایداری غشاهای سلولی، حفظ کلروفیل و فعال سازی سامانه آنتی اکسیدانی برخوردار است. این ویژگی ها موجب کاهش آسیب های اکسیداتیو و حفظ بهتر عملکرد سلولی شده و در نهایت تحمل بیشتر این ژنوتیپ به تنش خشکی را فراهم می کنند (شکل ۱).

۱/۱۰ به $1/40 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$ رسید. فعالیت CAT نیز در G. Cot.16 از ۹۰٪ به $1/80 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$ و در GISV-328 از ۹۰٪ به $1/40 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$ افزایش یافت. افزایش بیشتر فعالیت این آنزیم ها در ژنوتیپ متحمل نشان دهنده کارایی بالاتر سامانه دفاع آنتی اکسیدانی در حذف گونه های فعال اکسیژن و کاهش تنش اکسیداتیو است. در مجموع، نتایج فیزیولوژی و بیوشیمیایی



شکل ۱. تغییرات محتوای نسبی آب، (B) پتانسیل اسمزی، (C) نشت الکترولیتی، (D) محتوای پرولین، (E) محتوای مالون دی آلدئید، (F) محتوای کل کلروفیل، (G) فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، (H) آسکوربات پراکسیداز، و (I) کاتالاز در ژنوتیپ های G. Cot.16 و GISV-328 تحت شرایط آبیاری کامل (WW) رنگ سبز، و تنش خشکی (DS) به رنگ زرد

پس از انجام کنترل کیفیت شامل حذف آداپتورها، فیلتر کردن خوانش های کم کیفیت و حذف داده های نامعتبر، داده های با کیفیت برای هم ترازی با ژنوم مرجع پنبه استفاده شدند. نتایج هم ترازی نشان داد که بخش عمده خوانش ها به نواحی رمز شونده ژنوم (اگزونی) نگاشت شده اند که بیانگر کیفیت مناسب داده های توالی یابی است.

در ژنوتیپ G. Cot.16، حدود ۸۵/۵٪ از خوانش ها به نواحی اگزونی، ۶/۵٪ به نواحی اینترونی و ۸٪ به

آمار توالی یابی آرانا و هم ترازی خوانش ها با ژنوم مرجع

به منظور بررسی الگوی بیان ژن ها در پاسخ به تنش خشکی، نمونه های ریشه دو ژنوتیپ پنبه شامل GISV-328 (حساس به خشکی) و G. Cot.16 (متحمل به خشکی)، هر کدام با سه تکرار زیستی و در دو شرایط آبیاری مطلوب (WW) و تنش خشکی (DS)، برای توالی یابی آرانا مورد استفاده قرار گرفتند. در مجموع حدود ۴۲۰ میلیون خوانش خام از تمامی نمونه ها تولید شد.

"دالوند و همکاران، عنوان: تحلیل یکپارچه فیزیولوژی و ترنسکریپتوم برای شناسایی سازوکارهای تحمل ..."

(حساس به خشکی) و G. Cot.16 (متحمل به خشکی) در شرایط آبیاری مطلوب و تنش خشکی بررسی شد (شکل ۳c و جدول S2).

در مقایسه بین دو ژنوتیپ در شرایط آبیاری مطلوب (G. Cot.16 (WW) در برابر GISV-328 (WW)، ۲۲۵ ژن افزایش بیان و ۱۵۰ ژن کاهش بیان مشاهده شد. این اختلاف نشان می‌دهد که حتی پیش از اعمال تنش، تفاوت‌های بنیادی در تنظیم بیان ژن بین دو ژنوتیپ وجود دارد. در پاسخ به تنش خشکی در ژنوتیپ متحمل G. Cot.16 (DS) مقایسه (G. Cot.16 (WW) ۳۰۵ ژن افزایش بیان و ۲۰۰ ژن کاهش بیان شناسایی شد (شکل ۳c). این نتیجه نشان می‌دهد که ژنوتیپ متحمل در مواجهه با کمبود آب، یک بازبرنامه‌ریزی گسترده در شبکه ژنی خود ایجاد می‌کند و مجموعه‌ای از ژن‌های مرتبط با سازگاری و دفاع را فعال می‌سازد.

در ژنوتیپ حساس GISV-328 نیز مقایسه (GISV-328 (DS) در برابر GISV-328 (WW)، ۲۵۰ ژن افزایش بیان و ۲۲۵ ژن کاهش بیان مشاهده شد. با وجود فعال شدن پاسخ‌های تنشی، دامنه و انسجام این پاسخ‌ها نسبت به ژنوتیپ متحمل محدودتر است (شکل ۳c). مقایسه مستقیم دو ژنوتیپ تحت تنش (GISV-328 (DS) در برابر G. Cot.16 (DS) نشان داد که ۳۹۸ ژن افزایش بیان و ۲۸۵ ژن کاهش بیان دارند (شکل ۳c) این اختلاف بیانگر آن است که تنش خشکی تفاوت‌های مولکولی دو ژنوتیپ را به‌طور واضح آشکار کرده و ژنوتیپ متحمل مسیرهای پاسخ پیچیده‌تر و کارآمدتری را فعال می‌کند. همچنین برخی از این ژن‌ها در چندین مقایسه مشترک بودند (شکل ۳d) که نشان‌دهنده نقش کلیدی آن‌ها در پاسخ مرکزی به خشکی است.

از نظر عملکردی، در G. Cot.16 ژن‌های دارای بیان تفاضلی عمدتاً در مسیرهای حفاظت سلولی و

نواحی بین‌ژنی (intergenic) هم‌تراز شدند (شکل ۲a). در مقابل، در ژنوتیپ GISV-328، ۸۳/۲٪ از خوانش‌ها به نواحی اگزونی، ۸/۲٪ به نواحی اینترونی و ۸/۶٪ به نواحی بین‌ژنی نگاشت شدند (شکل ۲b) این اختلاف‌های جزئی می‌تواند ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی یا الگوهای بیان بین دو ژنوتیپ باشد. به‌طور کلی، درصد بالای نگاشت خوانش‌ها به نواحی اگزونی در هر دو ژنوتیپ نشان‌دهنده کیفیت مطلوب کتابخانه‌های RNA-seq و موفقیت فرآیند هم‌ترازسازی است.

برای مقایسه الگوی بیان ژن‌ها، چهار گروه آزمایشی شامل GISV-328 تحت تنش خشکی (GISV-328-DS)، GISV-328 در شرایط آبیاری مطلوب (GISV-328-WW)، G. Cot.16 تحت تنش خشکی (G. Cot.16-DS و G. Cot.16) در شرایط آبیاری مطلوب (G. Cot.16-WW) تحلیل شدند. سطح بیان ژن‌ها در تمامی نمونه‌ها بر اساس شاخص FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) محاسبه شد. این شاخص با نرمال‌سازی بر اساس طول ژن و عمق توالی‌یابی، امکان مقایسه دقیق بیان ژن‌ها بین نمونه‌های مختلف را فراهم می‌کند. در مجموع، ۳۲،۵۴۸ ژن در ژنوم مرجع پنبه در نمونه‌های مورد مطالعه دارای بیان قابل تشخیص بودند. این تعداد بیان ژنی نشان‌دهنده پوشش مناسب داده‌های RNA-seq و فراهم بودن یک بستر قابل اعتماد برای شناسایی ژن‌های دارای بیان تفاضلی و تحلیل مسیرهای مولکولی مرتبط با تحمل خشکی در دو ژنوتیپ است.

ژن‌های دارای بیان تفاضلی در پاسخ به تنش خشکی

برای شناسایی ژن‌هایی که در اثر تنش خشکی تغییر معنی‌دار در بیان نشان دادند، از معیار $|\log_2FC| \geq 1$ و $FDR \leq 0.05$ استفاده شد. الگوی بیان ژن‌ها در دو ژنوتیپ پنبه GISV-328

حالی که GISV-328 بیشتر به پاسخ‌های ساختاری و محدود متکی است.

طبقه‌بندی عملکردی ژن‌های دارای بیان تفاضلی

برای شناسایی فرایندهای زیستی و مسیرهای مولکولی مؤثر در پاسخ پنبه به تنش خشکی، ژن‌های دارای بیان تفاضلی با استفاده از تحلیل‌های غنی‌سازی GO و KEGG مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج تحلیل GO نشان داد که این ژن‌ها در ۱۴۳ اصطلاح عملکردی طبقه‌بندی می‌شوند که شامل ۱۰۸ اصطلاح مربوط به فرایندهای زیستی (Biological Process)، ۲۷ اصطلاح مرتبط با عملکردهای مولکولی (Molecular Function) و ۱۰ اصطلاح مربوط به اجزای سلولی (Cellular Component) بودند.

در ژنوتیپ متحمل G. Cot.16، تنش خشکی موجب غنی‌شدگی معنی‌دار ژن‌های مرتبط با فعالیت‌های کاتالیتیکی، فعالیت هیدرولازها و عملکردهای ساختاری مولکولی شد. در بخش فرایندهای زیستی نیز اصطلاحاتی نظیر متابولیسم کربوهیدرات‌ها، انتقال یون‌ها، انتقال کاتیون‌ها و سازمان‌دهی یا بی‌وزن دیواره سلولی بیشترین فراوانی را داشتند. همچنین در سطح اجزای سلولی، کمپلکس‌های ماکرومولکولی، اجزای غشایی، دیواره سلولی، پلاسمودسماتا و ناحیه خارج سلولی به‌عنوان مهم‌ترین گروه‌های غنی‌شده شناسایی شدند (جدول S3 و شکل تکمیلی ۱). غنی‌شدگی این دسته‌ها نشان می‌دهد که ژنوتیپ متحمل در پاسخ به کمبود آب علاوه بر تنظیم فعالیت‌های متابولیکی، فرایندهای انتقال مواد و بازآرایی ساختار دیواره سلولی را نیز به‌طور فعال تنظیم می‌کند.

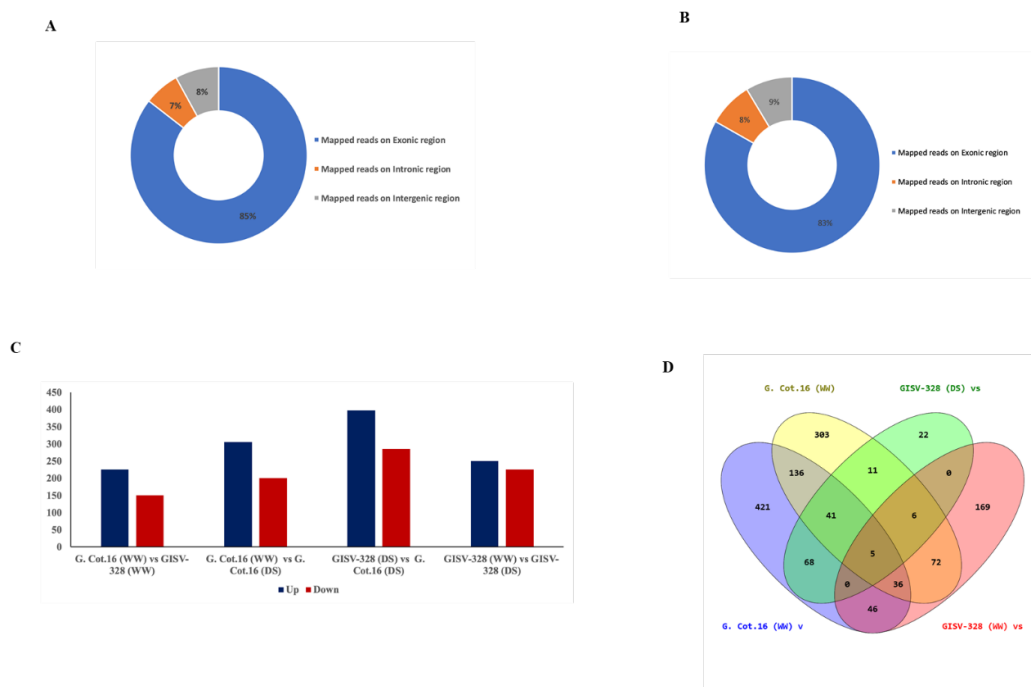
تنظیم تنش به‌صورت هماهنگ فعال شدند. این ژن‌ها شامل پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs)، فاکتورهای رونویسی وابسته به ABA مانند ABI5 و ERF، آکوپورین PIP2، گلوکاتینون S- ترانسفراز (GST)، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند پراکسیداز و تیوردوکسین ردوکتاز و ژن‌های مرتبط با تنظیم اسمزی و متابولیسم قندها هستند. این الگو نشان‌دهنده فعال شدن هم‌زمان چند لایه دفاعی شامل کنترل تنش اکسیداتیو، پایداری پروتئین‌ها و تنظیم وضعیت آبی سلول است.

در مقابل، در GISV-328 ژن‌های القاشده عمدتاً در فرایندهای ساختاری مانند بازآرایی دیواره سلولی و تغییرات غشایی نقش داشتند. از جمله این ژن‌ها می‌توان به Expansin، Expansin A8، XTH، A10 و Ureide permease 2 اشاره کرد که نشان‌دهنده یک پاسخ محدودتر و عمدتاً ساختاری به تنش هستند. همچنین در هر دو ژنوتیپ، ژن‌هایی مانند Ubiquitin E3 ligase، Cysteine، endopeptidase و Asparticase تغییر بیان نشان دادند که احتمالاً در فرایندهای تجزیه و بازچرخانی پروتئین‌ها در شرایط تنش نقش دارند.

در شرایط آبیاری مطلوب نیز، ژنوتیپ G. Cot.16 سطح بیان پایه بالاتری برای مجموعه‌ای از ژن‌های مرتبط با تحمل خشکی نشان داد. این ژن‌ها شامل ABA 8-hydroxylase، پراکسیدازها، ژن‌های مرتبط با فتوسنتز مانند D2 protein of PSII و APO1، فاکتورهای رونویسی ERF و پروتئین‌های انتقال لیپید (LTPs) بودند. این وضعیت بیان پایه بالاتر می‌تواند به‌عنوان نوعی priming مولکولی در نظر گرفته شود که باعث آمادگی سریع‌تر ژنوتیپ متحمل در مواجهه با خشکی می‌شود. در مجموع، نتایج نشان می‌دهد که تحمل به خشکی در

G. Cot.16 ناشی از فعال‌سازی گسترده‌تر شبکه‌های دفاعی و تنظیمی و همچنین وجود سطح بیان پایه بالاتر در ژن‌های کلیدی است، در

"دالوند و همکاران، عنوان: تحلیل یکپارچه فیزیولوژی و ترنسکریپتوم برای شناسایی سازوکارهای تحمل ..."



شکل ۲. آمار هم تراز سازی داده های توالی یابی: A و B) توزیع درصد خوانش های هم تراز شده با نواحی اگزونی، اینترونی و بین ژنی ژنوم مرجع *G. hirsutum* (C) تعداد ژن های دارای بیان تفاضلی (DEGs) با افزایش و کاهش بیان در مقایسه های مختلف و D) نمودار ون (Venn) نمایش دهنده ژن های دارای بیان تفاضلی مشترک و اختصاصی در مقایسه های مختلف

مقایسه دو ژنوتیپ در شرایط تنش خشکی، تفاوت های آشکاری را در راهبردهای مولکولی مقابله با کمبود آب نشان داد (جدول S5 و شکل تکمیلی ۱). مهم ترین اصطلاحات غنی شده شامل اتصال به ATP، اتصال به یون کلسیم، فعالیت های آنتی اکسیدانی، پاسخ به محرک های محیطی، پاسخ به تنش، متابولیسم آران، تنظیم بیان ژن، توسعه سیستم ریشه، پاسخ به کم آبی و پاسخ به اتیلن بودند. همچنین ژن های مرتبط با متیلاسیون و دمتیلاسیون دی ان ا و سایر فرایندهای تنظیم اپی ژنتیکی نیز به طور معنی داری غنی شدند. در بخش اجزای سلولی، غشای پلاسمایی و هسته بیشترین سهم را در میان ژن های دارای بیان تفاضلی داشتند. این یافته ها نشان می دهد که تحمل خشکی در *G. Cot.16* تا حد زیادی به فعال

در ژنوتیپ حساس GISV-328، ژن های پاسخ دهنده به خشکی عمدتاً در فرآیندهای متابولیکی عمومی، فعالیت های کاتالیتیکی و عملکردهای مرتبط با کلروپلاست و پلاستیدها مشارکت داشتند (جدول S4 و شکل تکمیلی ۱). علاوه بر این، غنی شدگی اصطلاحاتی نظیر سازمان دهی دیواره سلولی، فعالیت متیل ترانسفرازها، فعالیت اندوپتیدازها و فرآیندهای مرتبط با آمینواسیلاسیون tRNA مشاهده شد. این نتایج نشان می دهد که پاسخ ژنوتیپ حساس بیشتر بر تغییرات متابولیکی و ساختاری متمرکز است و کمتر از سازوکارهای تنظیمی پیچیده برای سازگاری با تنش بهره می گیرد.

شدن شبکه‌های تنظیمی، اپی‌ژنتیکی و پیام‌رسانی وابسته است.

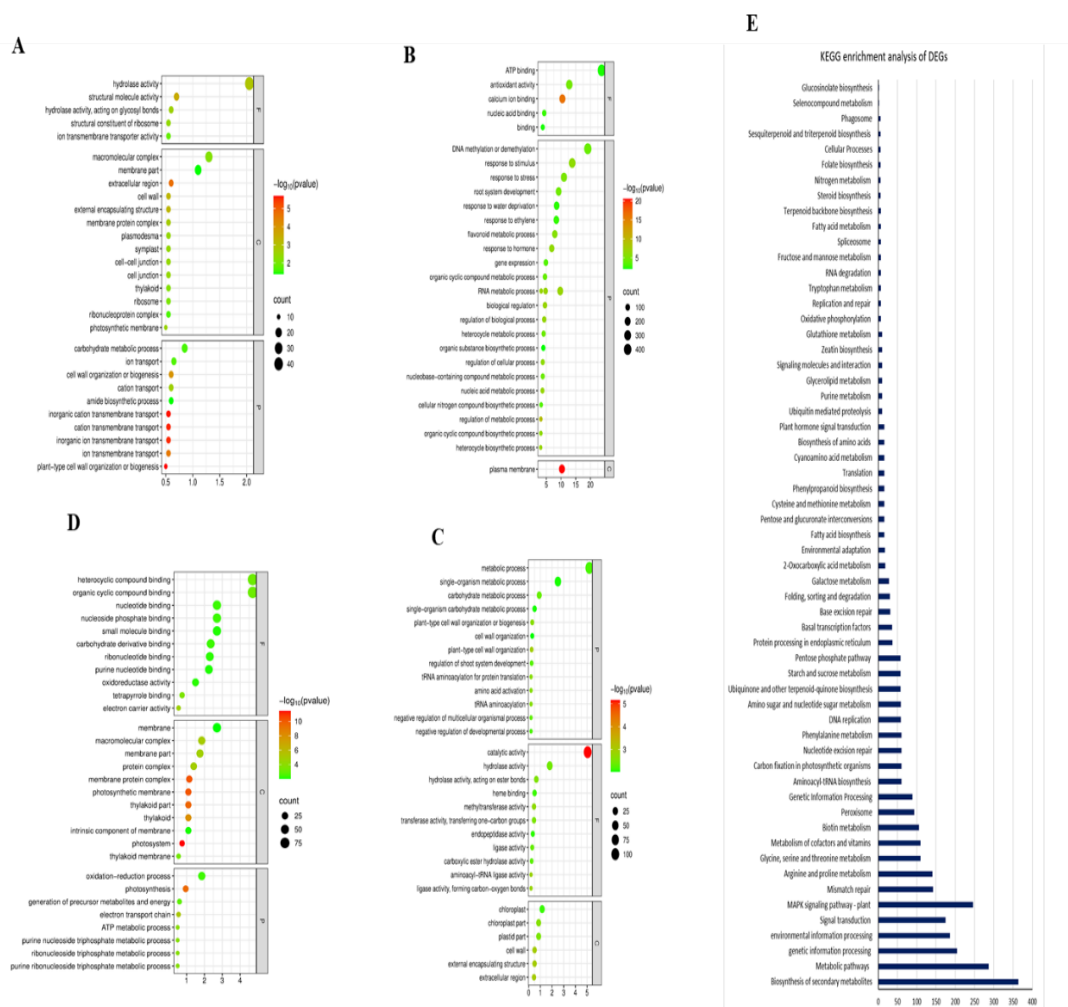
در شرایط آبیاری مطلوب نیز تفاوت‌های ذاتی قابل توجهی بین دو ژنوتیپ مشاهده شد. در *G. Cot.16* غنی‌شدگی اصطلاحات مرتبط با فتوسنتز، زنجیره انتقال الکترون، متابولیسم ATP، فعالیت اکسیدوردوکتازها و اجزای غشایی کلروپلاست و تیلاکوئید مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که ژنوتیپ متحمل حتی پیش از اعمال تنش از ظرفیت متابولیکی و فتوسنتزی بالاتری برخوردار است که می‌تواند نوعی آمادگی فیزیولوژیک برای مواجهه با تنش‌های محیطی ایجاد کند.

بررسی ژن‌های مرتبط با مسیرهای هورمونی نیز نقش محوری سیگنالینگ هورمونی در پاسخ به خشکی را آشکار کرد. در مسیر اکسین، بیان دو ژن *AUX1* و چهار عضو خانواده *AUX/IAA* کاهش یافت، در حالی که تنها یک ژن از خانواده *SAUR* افزایش بیان نشان داد. در مقابل، در مسیر اسید آبسزیک، چهار ژن از خانواده *PP2C* و دو ژن *SnPK2* به‌طور معنی‌داری القا شدند. افزایش بیان این ژن‌ها بیانگر فعال شدن مسیر انتقال پیام وابسته به ABA و نقش کلیدی آن در تنظیم پاسخ‌های سازشی پنبه به کمبود آب است.

تحلیل KEGG نیز ۵۶ مسیر متابولیکی و تنظیمی را به‌عنوان مسیرهای تحت تأثیر تنش خشکی شناسایی کرد. مهم‌ترین این مسیرها شامل متابولیسم عمومی، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، انتقال پیام سلولی، مسیر انتقال پیام MAPK، متابولیسم آرژنین و پرولین، متابولیسم گلیسین، سرین و ترئونین، متابولیسم کوفاکتورها و

ویتامین‌ها، متابولیسم بیوتین و مسیرهای مرتبط با ترمیم DNA بودند. در میان این مسیرها، مسیر MAPK یکی از برجسته‌ترین مسیرهای پاسخ به خشکی بود و تمامی ژن‌های شناسایی‌شده در این مسیر افزایش بیان نشان دادند. این ژن‌ها عمدتاً شامل اعضای خانواده‌های *PP2C*، پروتئین‌کینازها و کیتینازها بودند که در دریافت و انتقال سیگنال‌های ناشی از تنش نقش دارند. همچنین در مسیر متابولیسم نشاسته و ساکارز، هم ژن‌های افزایشی و هم کاهش‌ی مشاهده شد که نشان‌دهنده بازتنظیم متابولیسم کربوهیدرات‌ها برای تأمین انرژی و حفظ تعادل اسمزی در شرایط کم‌آبی است. افزون بر این، مسیرهای بیوسنتز فلاونوئیدها و فنیل‌پروپانوئیدها نیز فعال شدند و تعدادی از ژن‌های این مسیرها افزایش بیان معنی‌داری نشان دادند که حاکی از تقویت سامانه دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه است. در همین راستا، اکثر ژن‌های مرتبط با متابولیسم گلوکوتایون، به‌ویژه اعضای خانواده گلوکوتایون *S*-ترانسفراز (*GST*)، نیز در شرایط تنش القا شدند. به‌طور کلی، نتایج تحلیل‌های GO و KEGG نشان می‌دهد که پاسخ پنبه به تنش خشکی حاصل برهم‌کنش پیچیده شبکه‌ای از مسیرهای تنظیمی، هورمونی و متابولیکی است. در این میان، ژنوتیپ متحمل *G. Cot.16* با فعال‌سازی مؤثرتر مسیرهای انتقال پیام، تنظیم بیان ژن، توسعه سیستم ریشه، متابولیسم اسمولیت‌ها و سامانه‌های آنتی‌اکسیدانی، توانایی بیشتری در حفظ همئوستازی سلولی و سازگاری با شرایط کمبود آب نسبت به ژنوتیپ حساس GISV-328 نشان می‌دهد.

"دالوند و همکاران، عنوان: تحلیل یکپارچه فیزیولوژی و ترنسکریپتوم برای شناسایی سازوکارهای تحمل ..."



شکل ۳. تحلیل غنی‌سازی عملکردی ژن‌های دارای بیان تفاضلی در پاسخ به تنش خشکی (A-D) نتایج تحلیل غنی‌سازی هستی‌شناسی ژن برای چهار گروه مقایسه‌ای مختلف. اصطلاحات با $P\text{-value} < 0.01$ نمایش داده شده‌اند و در سه رده شامل فرایند زیستی (BP)، عملکرد مولکولی (MF) و جزء سلولی (CC) طبقه‌بندی شده‌اند. اندازه دایره‌ها بیانگر تعداد ژن‌های غنی‌شده (Count) و طیف رنگی نشان‌دهنده سطح معنی‌داری آماری ($\log_{10}P\text{-value}$) است. (E) نتایج تحلیل غنی‌سازی مسیرهای KEGG برای ژن‌های دارای بیان تفاضلی که مسیرهای زیستی به‌طور معنی‌دار غنی‌شده را نشان می‌دهد.

میان این خانواده‌ها، اعضای خانواده‌های bHLH، WRKY و NAC بیشترین فراوانی را داشتند که نشان‌دهنده اهمیت این تنظیم‌کننده‌ها در پاسخ پنبه به تنش خشکی است. بررسی الگوهای بیان ژن در دو ژنوتیپ GISV-328 و G. Cot.16 نشان داد که تنش خشکی موجب القای گسترده فاکتورهای رونویسی در هر دو ژنوتیپ می‌شود، اگرچه شدت این پاسخ در ژنوتیپ متحمل بیشتر

ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی پاسخ‌دهنده به تنش خشکی

فاکتورهای رونویسی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های بیان ژن هستند که نقش کلیدی در هماهنگی پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند. در این مطالعه، ۷۲ ژن رمزکننده فاکتور رونویسی متعلق به ۱۰ خانواده مختلف به‌عنوان ژن‌های دارای بیان تفاضلی شناسایی شدند (جدول S2) در

ساختارهای سلولی نقش دارند، القای این مسیرها می‌تواند به سازگاری گیاه با شرایط خشکی کمک کند.

با این حال، گروهی از ژن‌های پاسخ‌دهنده به خشکی به صورت اختصاصی در ژنوتیپ متحمل *G. Cot.16* افزایش بیان نشان دادند. این ژن‌ها عمدتاً در مسیرهای متابولیسم انرژی، فسفریلاسیون اکسیداتیو، متابولیسم اسیدهای آمینه، تجزیه اسیدهای چرب و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مشارکت داشتند. فعال شدن این مسیرها نشان می‌دهد که ژنوتیپ متحمل در مواجهه با کمبود آب نه تنها سامانه‌های دفاعی خود را تقویت می‌کند، بلکه از طریق حفظ تولید انرژی، تعادل اسمزی و افزایش سنتز ترکیبات حفاظتی، توانایی بیشتری برای حفظ همئوستازی سلولی و ادامه رشد در شرایط تنش دارد. در مجموع، نتایج این بخش نشان می‌دهد که تحمل بیشتر ژنوتیپ *G. Cot.16* به خشکی با فعال‌سازی گسترده‌تر شبکه‌های تنظیمی شامل فاکتورهای رونویسی کلیدی، ژن‌های پیام‌رسان و مسیرهای متابولیسمی مرتبط با تولید انرژی، تنظیم اسمزی و دفاع آنتی‌اکسیدانی همراه است. این شبکه تنظیمی پیچیده امکان پاسخ سریع‌تر و کارآمدتر به تنش خشکی را فراهم کرده و در نهایت موجب افزایش سازگاری این ژنوتیپ با شرایط کمبود آب می‌شود.

بحث

سازوکارهای فیزیولوژیک و مولکولی مؤثر در تحمل خشکی در پنبه

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده رشد و عملکرد پنبه در مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان است و از طریق ایجاد اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی موجب کاهش رشد و عملکرد گیاه می‌شود (Ghorbanzadeh *et al.*, 2025). اگرچه پنبه نسبت

بود. مهم‌ترین فاکتورهای رونویسی القاشده به خانواده‌های AP2/ERF به‌ویژه زیرخانواده‌های ERF و WRKY (RAV) گروه‌های IIb و III، LBD و NF-Y، HD-ZIP، bHLH، bZIP، NAC تعلق داشتند. مطالعات پیشین نیز نقش این خانواده‌ها را در تنظیم مسیرهای وابسته به ABA، حفظ تعادل اسمزی، کنترل تنش اکسیداتیو و تنظیم رشد گیاه در شرایط کمبود آب تأیید کرده‌اند. بنابراین، افزایش بیان این فاکتورها احتمالاً در فعال‌سازی ژن‌های حفاظتی و ایجاد پاسخ‌های سازشی در برابر خشکی نقش مهمی دارد.

علاوه بر فاکتورهای رونویسی، تعدادی از ژن‌های تنظیمی و عملکردی مرتبط با تحمل تنش نیز افزایش بیان نشان دادند. از مهم‌ترین این ژن‌ها می‌توان به ژن‌های رمزکننده ناقل‌های ABC و آنزیم‌های خانواده سیتوکروم P450 اشاره کرد. ناقل‌های ABC در انتقال ترکیبات مختلف، از جمله متابولیت‌ها و مولکول‌های پیام‌رسان، نقش دارند؛ در حالی که آنزیم‌های سیتوکروم P450 در تنظیم متابولیسم ثانویه، سم‌زدایی و سازگاری گیاه با شرایط نامساعد محیطی مشارکت می‌کنند. افزایش بیان این ژن‌ها بیانگر فعال شدن مسیرهای انتقال مواد و تنظیم متابولیسمی در پاسخ به تنش خشکی است. بررسی ژن‌های پاسخ‌دهنده به خشکی (Drought-Responsive Genes; DRGs) نشان داد که بخشی از این ژن‌ها در هر دو ژنوتیپ و در واکنش به تنش خشکی القا شده‌اند. از جمله مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به ژن‌های دخیل در متابولیسم آرژنین و پرولین و همچنین ژن‌های مرتبط با متابولیسم گالاکتوز اشاره کرد. افزایش بیان این ژن‌ها در هر دو ژنوتیپ نشان می‌دهد که تنظیم اسمزی و حفظ پایداری سلولی از پاسخ‌های عمومی پنبه به کمبود آب محسوب می‌شود. از آنجا که پرولین و قندهای محلول در حفظ فشار اسمزی، پایداری پروتئین‌ها و حفاظت از

"دالوند و همکاران، عنوان: تحلیل یکپارچه فیزیولوژی و ترنسکریپتوم برای شناسایی سازوکارهای تحمل ..."

آنتی اکسیدانی توانست تجمع ROS را کنترل کند. افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، APX، POX و GR همراه با کاهش سطح ROS و MDA نشان‌دهنده کارایی بالاتر سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در این ژنوتیپ است (Tang and Newton, 2005). این نتایج با داده‌های ترنسکریپتومی نیز هم‌راستا بود، به‌طوری‌که افزایش بیان ژن‌های مرتبط با متابولیسم گلوکاتیون و خانواده GST در ژنوتیپ متحمل مشاهده شد.

یکی دیگر از سازوکارهای مهم، تنظیم اسمزی از طریق تجمع اسمولیت‌ها به‌ویژه پرولین بود. پرولین علاوه بر تنظیم پتانسیل اسمزی، در پایداری پروتئین‌ها، حفاظت از غشاها و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد نقش دارد (Hosseini et al., 2020). تجمع بیشتر پرولین در G. Cot.16 نشان‌دهنده ظرفیت بالاتر این ژنوتیپ در حفظ همئوستازی اسمزی است. علاوه بر پرولین، تغییرات در متابولیسم اسیدهای آمینه نیز نقش مهمی در سازگاری با خشکی دارد. افزایش تجمع اسیدهای آمینه‌ای مانند گلوتامات و آسپارات می‌تواند در حفظ متابولیسم کربن و نیتروژن، پایداری آنزیم‌های فتوسنتزی و تأمین پیش‌سازهای متابولیت‌های حفاظتی نقش داشته باشد. همچنین غنی‌شدگی مسیرهای مرتبط با متابولیسم انرژی و فسفریلاسیون اکسیداتیو نشان‌دهنده بازآرایی گسترده شبکه متابولیکی در پاسخ به تنش است. در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تحمل خشکی در ژنوتیپ G. Cot.16 حاصل عملکرد هماهنگ مجموعه‌ای از سازوکارهای فیزیولوژیک و مولکولی شامل توسعه بهتر سیستم ریشه، حفظ کارایی فتوسنتزی، کنترل تنش اکسیداتیو از طریق سامانه آنتی اکسیدانی، تنظیم اسمزی از طریق تجمع پرولین و بازتنظیم مسیرهای متابولیکی است. این پاسخ‌های چندلایه موجب حفظ همئوستازی

به بسیاری از محصولات زراعی تحمل نسبی به کم‌آبی دارد، اما میزان این تحمل به ژنوتیپ، مرحله رشدی، شدت و مدت تنش و شرایط محیطی وابسته است (Khan et al., 2018). به‌ویژه در مرحله گلدهی، کمبود آب می‌تواند اثرات جبران‌ناپذیر بر کیفیت الیاف روغن و عملکرد نهایی داشته باشد (Çelik, 2023). بنابراین، شناسایی سازوکارهای فیزیولوژی و مولکولی مرتبط با تحمل خشکی برای بهبود ارقام پنبه اهمیت اساسی دارد.

نتایج این پژوهش نشان داد که تحمل خشکی در پنبه حاصل برهم‌کنش هماهنگ مجموعه‌ای از پاسخ‌های فیزیولوژیک و تنظیمی است. تنش خشکی تأثیر معنی‌داری بر پارامترهای فیزیو-بیوشیمیایی، در هر دو ژنوتیپ داشت، اما این تأثیر در رقم GISV-328 نسبت به رقم متحمل معنی‌دارتر بود. کاهش فتوسنتز در شرایط خشکی عمدتاً ناشی از بسته شدن روزنه‌ها و محدودیت در ورود CO₂ و کاهش ظرفیت تثبیت کربن است (Ullah et al., 2017; Qiao et al., 2024). این محدودیت علاوه بر کاهش تولید ماده خشک، موجب افزایش فشار الکتریکی در کلروپلاست و در نتیجه افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (Wang et al., 2019).

گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش نقش دوگانه دارند؛ در غلظت‌های کنترل‌شده به‌عنوان پیام‌رسان در مسیرهای وابسته به کلسیم، ABA و MAPK عمل می‌کنند، اما در صورت تجمع بیش از حد موجب برهم خوردن تعادل ردوکس، پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب به پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند (Azupio et al., 2025). در این مطالعه، افزایش معنی‌دار ROS مالون‌دی‌آلدئید در ژنوتیپ حساس GISV-328 نشان‌دهنده شدت بالاتر آسیب اکسیداتیو و تخریب غشایی در ژنوتیپ حساس بود. در مقابل، ژنوتیپ G. Cot.16 با فعال‌سازی مؤثر سامانه

سلولی و افزایش سازگاری گیاه با شرایط کم آبی می شوند.

شبکه های پیام رسانی و مسیرهای مولکولی دخیل در پاسخ پنبه به تنش خشکی

تحلیل نتایج بررسی پروفایل ترنسکریپتومی نشان داد که پاسخ پنبه به تنش خشکی با بازآرایی گسترده و هماهنگ مسیرهای متابولیکی و شبکه های انتقال پیام همراه است. بر اساس نتایج KEGG، ژن های دارای بیان تفاضلی در مسیرهای متعددی از جمله متابولیسم گالاکتوز، تجزیه اسیدهای آمینه شاخه دار (والین، لوسین و ایزولوسین)، متابولیسم آرژنین و پرولین، بیوسنتز کاروتنوئیدها، متابولیسم نیتروژن، انتقال پیام MAPK، سیگنالینگ هورمونی گیاهی، بیوسنتز فلاونوئیدها و تنظیم ریتم شبانه روزی غنی شدند. این الگو نشان می دهد که سازگاری پنبه با کمبود آب نتیجه یک شبکه پیچیده از مسیرهای تنظیمی، متابولیکی و دفاعی است. در میان مسیرهای شناسایی شده، مسیرهای انتقال پیام MAPK، سیگنالینگ هورمونی و بیوسنتز فلاونوئیدها در هر دو ژنوتیپ GISV-328 و G. Cot.16 به طور معنی دار غنی شدند. این موضوع بیانگر وجود یک هسته پاسخ حفاظتی محافظت شده (conserved core response) در برابر تنش خشکی است که در ادراک تنش، انتقال سیگنال و فعال سازی پاسخ های اولیه دفاعی نقش دارد (Han et al., 2025). با این حال، مقایسه دو ژنوتیپ نشان داد که نحوه سازمان دهی این پاسخ ها متفاوت است. در ژنوتیپ حساس GISV-328، پاسخ ها عمدتاً به مسیرهای متابولیسم ثانویه و واکنش های دفاعی عمومی محدود بودند، در حالی که در ژنوتیپ متحمل G. Cot.16 غنی شدگی پررنگ تری در مسیرهای مرتبط با متابولیسم اسیدهای آمینه، به ویژه آرژنین و پرولین مشاهده شد. این موضوع نشان می دهد که

تحمل خشکی علاوه بر فعال سازی پاسخ های عمومی، به بازتنظیم دقیق متابولیسم مرکزی و حفظ هموستازی سلولی وابسته است (Zhong et al., 2025).

یکی از محورهای اصلی پاسخ به خشکی، فعال شدن سریع شبکه های پیام رسانی وابسته به کلسیم و اسید آسبازیک (ABA) است. در این مطالعه، تعداد قابل توجهی از ژن های مرتبط با کلسیم شامل کالمودولین ها (CMLs)، پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم (CDPKs)، پروتئین های حسگر کلسیم، CIPKs و RLCKs دارای بیان تفاضلی بودند. این اجزا از عناصر کلیدی انتقال پیام کلسیمی محسوب می شوند و در تنظیم تعادل یونی، ادراک تنش و فعال سازی پاسخ های دفاعی نقش دارند (Rose, 2023). همزمان، مسیر سیگنالینگ ABA نیز در هر دو ژنوتیپ به طور قابل توجهی فعال شد، هرچند شدت آن در شرایط تنش بیشتر بود. افزایش بیان ژن های خانواده PP2C و SnRK2 نشان می دهد که این مسیر یکی از محورهای مرکزی پاسخ به خشکی در پنبه است. فعال شدن سیگنالینگ ABA می تواند از طریق تنظیم بیان ژن های پاسخ دهنده به تنش، کنترل تنظیم اسمزی، و حفظ وضعیت آبی گیاه، نقش کلیدی در سازگاری ایفا کند. همچنین افزایش بیان برخی کینازهای سرین/ترونین با نقش شناخته شده آن ها در مسیر ABA و پاسخ به کم آبی همخوانی داشت (Lim et al., 2020).

از سوی دیگر، مسیر متابولیسم اینوزیتول نیز در پاسخ به خشکی فعال شد. افزایش بیان ژن های مرتبط با 5- inositol polyphosphate phosphatase نشان دهنده نقش احتمالی این مسیر در تنظیم سیگنالینگ سلولی و سازگاری اسمزی است. مطالعات پیشین نیز نشان داده اند که تغییر در متابولیسم اینوزیتول می تواند موجب افزایش تحمل به خشکی و کاهش اتلاف آب شود (Rabara et al., 2015). در مجموع، نتایج این

"دالوند و همکاران، عنوان: تحلیل یکپارچه فیزیولوژی و ترنسکریپتوم برای شناسایی سازوکارهای تحمل ..."

یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های پاسخ به خشکی در گیاهان محسوب می‌شود و در فرآیندهایی نظیر توسعه ریشه، تنظیم اسمزی و کنترل بیان ژن‌های حفاظتی نقش دارد. در این پژوهش، ۲۵ ژن *NAC* دارای بیان تفاضلی شناسایی شد که از میان آن‌ها *NAC65*، *NAC90*، *NAC87*، *NAC18*، *NAC100* و *NAC102* بیشترین افزایش بیان را نشان دادند. این الگو با گزارش‌های پیشین همخوان است که *NAC*ها را به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های مرکزی شبکه پاسخ به تنش معرفی کرده‌اند (Xiong *et al.*, 2025). در ادامه این شبکه تنظیمی، خانواده *WRKY* نقش مهمی در یکپارچه‌سازی سیگنال‌های وابسته به *ABA*، *کلسیم* و *ROS* ایفا می‌کند. تغییر در بیان این ژن‌ها منجر به بازبرنامه‌ریزی گسترده بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش می‌شود (Li *et al.*, 2025). در این مطالعه، چندین عضو *WRKY* افزایش بیان داشتند و *WRKY75* بیشترین تغییر را نشان داد. با توجه به نقش گزارش‌شده *WRKY75* در تنظیم رشد ریشه و سازگاری به تنش، این ژن می‌تواند یکی از عوامل مؤثر در تحمل بیشتر ژنوتیپ متحمل *Cot.16* باشد (Khan *et al.*, 2018). در سطح پروتئینی، پروتئین‌های شوک حرارتی یکی از مهم‌ترین مؤلفه‌های حفاظت سلولی در شرایط تنش هستند. این پروتئین‌ها به‌عنوان چپرون‌های مولکولی، در تاخوردگی صحیح پروتئین‌ها، جلوگیری از تجمع پروتئین‌های دناتوره، مونتاژ کمپلکس‌های پروتئینی و حفظ همئوستازی پروتئومی نقش دارند (Frydman, 2001). خانواده‌های اصلی *HSP* شامل *Hsp100*، *Hsp90*، *Hsp70*، *Hsp60* و *sHSPs* هستند که در میان آن‌ها *Hsp70* نقش محوری در حفاظت از پروتئین‌های حساس به تنش دارد (Frydman *et al.*, 2001).

افزایش بیان *HSP*ها در پاسخ به تنش‌های محیطی از جمله خشکی به‌طور گسترده گزارش شده است

مطالعه نشان می‌دهد که تحمل بالاتر ژنوتیپ *G. Cot.16* حاصل تعامل چندلایه و هماهنگ شبکه‌های سیگنالینگ کلسیمی، مسیر *ABA*، مسیر *MAPK*، متابولیسم اینوزیتول، تنظیم‌کننده‌های رونویسی و بازآرایی متابولیسم اسیدهای آمینه است. این شبکه یکپارچه با تنظیم دقیق بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش، حفظ تعادل اسمزی، کاهش آسیب اکسیداتیو و پشتیبانی از عملکردهای حیاتی سلول، ظرفیت سازگاری گیاه را در شرایط کمبود آب به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد.

فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌های شوک

حرارتی در تنظیم پاسخ پنبه به تنش خشکی

فاکتورهای رونویسی (TFs) از اجزای کلیدی تنظیم بیان ژن در گیاهان هستند و نقش مرکزی در هماهنگ‌سازی پاسخ‌های مولکولی به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارند (Thilakarathne *et al.*, 2025). در این مطالعه، تحلیل بیان ژن نشان داد که خانواده‌های *bHLH*، *NAC*، *WRKY* و *GATA* بیشترین سهم را در میان فاکتورهای رونویسی دارای بیان تفاضلی به خود اختصاص داده‌اند. افزایش بیان این گروه‌ها بیانگر نقش آن‌ها در سازمان‌دهی شبکه‌های تنظیمی مرتبط با سازگاری پنبه به کمبود آب است. در میان آن‌ها، خانواده *bHLH* به‌عنوان یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های فاکتورهای رونویسی گیاهی، در تنظیم رشد، توسعه و پاسخ به تنش نقش دارد. شواهد نشان می‌دهد که اعضای این خانواده از طریق کنترل هدایت روزنه‌ای، تنظیم تعادل ردوکس و تعدیل مسیرهای مرتبط با گونه‌های فعال اکسیژن در افزایش تحمل به خشکی نقش دارند (Ren *et al.*, 2021). در این مطالعه، ۲۶ ژن *bHLH* دارای بیان تفاضلی شناسایی شد که اغلب در شرایط تنش افزایش بیان نشان دادند، که بیانگر مشارکت فعال آن‌ها در پاسخ سازشی پنبه است. خانواده *NAC*

(Jiang *et al.*, 2020). این پروتئین‌ها علاوه بر حفاظت از ساختار پروتئینی، در کاهش آسیب اکسیداتیو و حفظ عملکرد متابولیکی سلول نیز نقش دارند (Al-Whaibi *et al.*, 2011). تنظیم بیان ژن‌های رمزگذار HSPها عمدتاً توسط فاکتورهای رونویسی HSF انجام می‌شود، اما شواهد نشان می‌دهد که HSFها در تنظیم ژن‌های مرتبط با سامانه آنتی‌اکسیدانی نیز نقش دارند و از این طریق ارتباطی میان پاسخ به تنش پروتئینی و پاسخ ردوکس برقرار می‌کنند. در این مطالعه، افزایش بیان ژن‌های HSP در ژنوتیپ متحمل G. Cot.16 نسبت به ژنوتیپ حساس GISV-328 مشاهده شد که نشان‌دهنده نقش مؤثر این پروتئین‌ها در افزایش ظرفیت تحمل به خشکی است. این الگو با گزارش‌های موجود در گیاهانی مانند صنوبر، اسفناج و سیب‌زمینی نیز همخوانی دارد (Lawas *et al.*, 2018). نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که پاسخ مولکولی پنبه به تنش خشکی از طریق یک شبکه تنظیمی چندلایه شامل مسیرهای ABA و MAPK، فاکتورهای رونویسی NAC، WRKY، bHLH و DREB، و همچنین فاکتورهای HSF سازمان‌دهی می‌شود. فعال‌سازی این شبکه منجر به القای ژن‌های حفاظتی از جمله HSPها شده و از طریق حفظ پایداری پروتئین‌ها، تنظیم تعادل ردوکس، حفاظت از دستگاه فتوسنتزی، تنظیم رشد ریشه و کنترل تعادل اسمزی، تحمل گیاه به کمبود آب را افزایش می‌دهد. در این میان، هماهنگی میان فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌های شوک حرارتی یکی از مؤلفه‌های کلیدی برتری ژنوتیپ متحمل G. Cot.16 در شرایط تنش خشکی محسوب می‌شود.

نتیجه‌گیری

این پژوهش با ترکیب داده‌های فنوتیپی، فیزیولوژیک و ترنسکرپتومی، سازوکارهای مؤثر در تحمل خشکی را در دو ژنوتیپ پنبه شامل GISV-

328 (حساس به خشکی) و G. Cot.16 (متحمل به خشکی) مورد بررسی قرار داد. نتایج نشان داد که برتری تحمل در ژنوتیپ G. Cot.16 حاصل یک پاسخ چندلایه و هماهنگ در سطوح فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی است که در مجموع به حفظ وضعیت آبی، کاهش آسیب اکسیداتیو و پایداری عملکرد سلولی در شرایط کم‌آبی منجر می‌شود. در سطح فیزیولوژیک، ژنوتیپ متحمل با حفظ کارایی بهتر سیستم ریشه، فتوسنتز مؤثرتر، تنظیم اسمزی پایداری و فعالیت بالاتر سامانه آنتی‌اکسیدانی توانست اثرات مخرب تنش خشکی را به‌طور قابل توجهی کاهش دهد. این سازگاری با کاهش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن و مالون‌دی‌آلدئید و همچنین افزایش تجمع اسمولیت‌هایی مانند پرولین همراه بود که نقش کلیدی در حفظ یکپارچگی غشاها و پایداری سلولی ایفا می‌کنند. در سطح مولکولی، تحلیل RNA-Seq در مجموع ۱۴۶۵ ژن دارای بیان تفاضلی را شناسایی کرد که در مسیرهای کلیدی شامل انتقال پیام هورمونی (به‌ویژه ABA)، سیگنالینگ MAPK، متابولیسم کربوهیدرات‌ها و اسیدهای آمینه، بیوسنتز فلاونوئیدها و سایر متابولیت‌های ثانویه، تنظیم اسمزی و پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی غنی شده بودند. افزون بر این، افزایش بیان ژن‌های مرتبط با فاکتورهای رونویسی خانواده‌های NAC، WRKY، bHLH و DREB، به همراه ژن‌های HSP، پروتئین‌های LEA و سایر ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش، نشان‌دهنده کنترل چندلایه و شبکه‌ای پاسخ به خشکی در پنبه است. نتایج همچنین بر نقش کلیدی تعامل میان سیگنالینگ هورمونی، مسیرهای وابسته به کلسیم، شبکه MAPK و بازآرایی متابولیسم اسیدهای آمینه در ایجاد تحمل به خشکی تأکید دارد. به نظر می‌رسد فعال‌سازی هماهنگ این شبکه‌های تنظیمی در ژنوتیپ G. Cot.16 موجب تقویت تنظیم اسمزی، حفظ تعادل ردوکس، افزایش

"دالوند و همکاران، عنوان: تحلیل یکپارچه فیزیولوژی و ترنسکریپتوم برای شناسایی سازوکارهای تحمل ..."

در اقلیم‌های خشک و نیمه‌خشک فراهم می‌سازد. استفاده از ارقام متحمل با عملکرد پایدار در شرایط کم آبی می‌تواند از افت شدید تولید در سال‌های خشک سال جلوگیری کرده و نوسانات عرضه الیاف و روغن پنبه‌دانه را کاهش می‌دهد. این امر به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه که کشاورزی معیشت میلیون‌ها خانوار را تأمین می‌کند، تأثیری مستقیم بر کاهش فقر و افزایش دسترسی به غذا دارد.

ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی و در نهایت ارتقای سازگاری گیاه با شرایط کم‌آبی شده است. ژن‌ها و مسیرهای شناسایی شده در این مطالعه به‌ویژه فاکتورهای رونویسی به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های بالادست و نیز ژن‌های مؤثر در مسیرهای سیگنالینگ اهداف ارزشمندی برای استفاده در برنامه‌های به‌نژادی، از طریق گزینش به‌کمک نشانگر (MAS) یا ویرایش ژنوم برای تولید ارقامی با عملکرد و یک راهکار امنیت مبنای کشت پنبه

منابع

- Al-Whaibi MH. (2011) Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University Science*. 23(2): 139-150. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2010.06.021>.
- Azupio S, Wang Y, Obeng J, Issah AK, Chu J, Zhang H, Xie Q, Jiang X. (2026) Calcium-dependent protein kinases as central hubs in plant abiotic stress signaling: Mechanisms and prospects for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*. 16: 1711405. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1711405>.
- Baharum SN, Azizan KA. (2018) Metabolomics in systems biology. In: Aizat W, Goh HH, Baharum S. (eds.) Omics applications for systems biology. Advances in experimental medicine and biology. Springer, Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98758-3_4.
- Barrs HD, Weatherley PE. (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences*. 15(3): 413-428. <https://doi.org/10.1071/B19620413>.
- Bhauso TD, Thankappan R, Kumar A, Mishra GP, Dobaria JR, Venkat Rajam M. (2014) Over-expression of bacterial mtID gene confers enhanced tolerance to salt-stress and water-deficit stress in transgenic peanut (*Arachis hypogaea*) through accumulation of mannitol. *Australian Journal of Crop Science*. 8(3): 413-421.
- Bowne JB, Erwin TA, Juttner J, Schnurbusch T, Langridge P, Bacic A, Roessner U. (2012) Drought responses of leaf tissues from wheat cultivars of differing drought tolerance at the metabolite level. *Molecular Plant*. 5(2): 418-429. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr114>.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1-2): 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Çelik S. (2023) Assessing drought tolerance in a large number of upland cotton plants (*Gossypium hirsutum* L.) under different irrigation regimes at the seedling stage. *Life*. 13(10): 2067. <https://doi.org/10.3390/life13102067>.
- Chen ZH, Chen G, Dai F, Wang Y, Hills A, Ruan YL, Zhang G, Franks PJ, Nevo E, Blatt MR. (2017) Molecular evolution of grass stomata. *Trends in Plant Science*. 22(2): 124-139. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.09.005>.
- Evans JR, Santiago LS. (2014) PrometheusWiki gold leaf protocol: Gas exchange using LI-COR 6400. *Functional Plant Biology*. 41(3): 223-226. <https://doi.org/10.1071/FP10900>.
- Feng L, Wang L, Li J, Li X, Rong E, Wu Y. (2026) Integrated insights into drought tolerance mechanism of the autotetraploid from *Gossypium herbaceum* by transcriptome and physiological analyses. *Genes*. 17(4): 470. <https://doi.org/10.3390/genes17040470>.
- Flexas J, Barbour MM, Brendel O, Cabrera HM, Carriqui M, Díaz-Espejo A, Douthe C, Dreyer E,

- Ferrio JP, Gago J, Gallé A, Galmés J, Kodama N, Medrano H, Niinemets Ü, Peguero-Pina JJ, Pou A, Ribas-Carbó M, Tomás M, Warren CR. (2012) Mesophyll diffusion conductance to CO₂: An unappreciated central player in photosynthesis. *Plant Science*. 193-194: 70-84. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.05.009>.
- Frydman J. (2001) Folding of newly translated proteins in vivo: The role of molecular chaperones. *Annual Review of Biochemistry*. 70: 603-647. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.603>.
- Gechev TS, Benina M, Obata T, Tohge T, Sujeeth N, Minkov I, Hille J, Temanni MR, Marriott AS, Bergström E, Thomas-Oates J, Antonio C, Mueller-Roeber B, Schippers JH, Fernie AR, Toneva V. (2013) Molecular mechanisms of desiccation tolerance in the resurrection glacial relic *Haberlea rhodopensis*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 70(4): 689-709. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1155-6>.
- Ghorbanzadeh Z, Panahi B, Purhang L, Hossein Panahi Z, Zeinalabedini M, Mardi M, Hamid R, Ghaffari MR. (2025) Integrative genomics and precision breeding for stress-resilient cotton: Recent advances and prospects. *Agronomy*. 15(10): 2393. <https://doi.org/10.3390/agronomy15102393>.
- Gupta A, Rico-Medina A, Caño-Delgado AI. (2020) The physiology of plant responses to drought. *Science*. 368(6488): 266-269. <https://doi.org/10.1126/science.aaz7614>.
- Hamid R, Jacob F, Ghorbanzadeh Z, Mardi M, Ariaeenejad S, Zeinalabedini M, Ghaffari MR. (2024) Genome-wide identification and characterization of FORMIN genes in cotton: Implications for abiotic stress tolerance. *Plant Gene*. 40: 100474. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2024.100474>.
- Hamid R, Shahriari AG, Panahi B. (2026) Weighted gene co-expression network analysis identifies functional modules associated with multiple abiotic stressors in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*. 45(1): 690-709. <https://doi.org/10.1007/s00344-025-11898-y>.
- Han A, Fu W, Liusui Y, Zhong X, Zhang X, Wang Z, Li Y, Zhang J, Guo Y. (2025) Comparative transcriptome and metabolome profiling unveil genotype-specific strategies for drought tolerance in cotton. *Frontiers in Plant Science*. 16: 1610552. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1610552>.
- Heath RL, Packer L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125(1): 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1).
- Hiscox JD, Israelstam GF. (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*. 57(12): 1332-1334. <https://doi.org/10.1139/b79-163>.
- Hosseinifard M, Stefaniak S, Ghorbani Javid M, Soltani E, Wojtyła Ł, Garnczarska M. (2022) Contribution of exogenous proline to abiotic stresses tolerance in plants: A review. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(9): 5186. <https://doi.org/10.3390/ijms23095186>.
- Hua D, Wang C, He J, Liao H, Duan Y, Zhu Z, Guo Y, Chen Z, Gong Z. (2012) A plasma membrane receptor kinase, GHR1, mediates abscisic acid- and hydrogen peroxide-regulated stomatal movement in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 24(6): 2546-2561. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.100107>.
- Jiang C, Bi Y, Zhang R, Feng S. (2020) Expression of RcHSP70, heat shock protein 70 gene from Chinese rose, enhances host resistance to abiotic stresses. *Scientific Reports*. 10(1): 2445. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58745-6>.
- Khan A, Pan X, Najeeb U, Tan DKY, Fahad S, Zahoor R, Luo H. (2018) Coping with drought: Stress and adaptive mechanisms, and management through cultural and molecular alternatives in cotton as vital constituents for plant stress resilience and fitness. *Biological Research*. 51: 47. <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0198-z>.
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL. (2015) HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*. 12(4): 357-360. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3317>.
- Lawas LMF, Zuther E, Jagadish SK, Hinch DK. (2018) Molecular mechanisms of combined heat and drought stress resilience in cereals. *Current Opinion in Plant Biology*. 45: 212-217. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.04.002>.

"دالوند و همکاران، عنوان: تحلیل یکپارچه فیزیولوژی و ترنسکریپتوم برای شناسایی سازوکارهای تحمل ..."

- Li T, Li B, Wang Y, Xu J, Li W, Chen ZH, Mou W, Xue D. (2025) WRKY transcription factors in rice: Key regulators orchestrating development and stress resilience. *Plant, Cell and Environment*. 48(11): 8388-8406. <https://doi.org/10.1111/pce.70124>.
- Lim J, Lim CW, Lee SC. (2020) Pepper novel serine-threonine kinase CaDIK1 regulates drought tolerance via modulating ABA sensitivity. *Frontiers in Plant Science*. 11: 1133. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01133>.
- Panahi B, Hamid R. (2025) Decoding core molecular mechanisms related to multiple abiotic stress adaptation in cotton: Insights from RNA-seq data meta-analysis in combination with machine learning approach. *Current Plant Biology*. 43: 100503. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2025.100503>.
- Qiao M, Hong C, Jiao Y, Hou S, Gao H. (2024) Impacts of drought on photosynthesis in major food crops and the related mechanisms of plant responses to drought. *Plants*. 13(13): 1808. <https://doi.org/10.3390/plants13131808>.
- Rabara RC, Tripathi P, Reese RN, Rushton DL, Alexander D, Timko MP, Shen QJ, Rushton PJ. (2015) Tobacco drought stress responses reveal new targets for Solanaceae crop improvement. *BMC Genomics*. 16(1): 484. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1575-4>.
- Ren YR, Yang YY, Zhao Q, Zhang TE, Wang CK, Hao YJ, You CX. (2021) MdCIB1, an apple bHLH transcription factor, plays a positive regulator in response to drought stress. *Environmental and Experimental Botany*. 188: 104523. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104523>.
- Rodrigues J, Inzé D, Nelissen H, Saibo NJM. (2019) Source-sink regulation in crops under water deficit. *Trends in Plant Science*. 24(7): 652-663. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.04.005>.
- Rose A. (2023) Calcium decoding in *Marchantia polymorpha*: The roles of calcineurin B-like proteins (CBLs) and CBL-interacting protein kinases (CIPKs) in abiotic stress responses [Master's thesis, University of East Anglia]. CORE. <https://core.ac.uk/download/564419843.pdf>.
- Sengupta A, Chakraborty M, Saha J, Gupta B, Gupta K. (2016) Polyamines: Osmoprotectants in plant abiotic stress adaptation. In: Iqbal N, Nazar R, Khan NA (eds.) Osmolytes and plants acclimation to changing environment: Emerging omics technologies. Springer, India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2616-1_7.
- Skirycz A, De Bodt S, Obata T, De Clercq I, Claeys H, De Rycke R, Andriankaja M, Van Aken O, Van Breusegem F, Fernie AR. (2010) Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of *Arabidopsis* leaves to prolonged mild osmotic stress. *Plant Physiology*. 152(1): 226-244. <https://doi.org/10.1104/pp.109.148965>.
- Su Z, Ma X, Guo H, Sukiran NL, Guo B, Assmann SM, Ma H. (2013) Flower development under drought stress: Morphological and transcriptomic analyses reveal acute responses and long-term acclimation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 25(10): 3785-3807. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.115428>.
- Tang W, Newton RJ. (2005) Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43(8): 760-769. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.06.001>.
- Thilakarathne AS, Liu F, Zou Z. (2025) Plant signaling hormones and transcription factors: Key regulators of plant responses to growth, development, and stress. *Plants*. 14(7): 1070. <https://doi.org/10.3390/plants14071070>.
- Todaka D, Zhao Y, Yoshida T, Kudo M, Kidokoro S, Mizoi J, Kodaira KS, Takebayashi Y, Kojima M, Sakakibara H, Toyooka K, Sato M, Fernie AR, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2017) Temporal and spatial changes in gene expression, metabolite accumulation and phytohormone content in rice seedlings grown under drought stress conditions. *The Plant Journal*. 90(1): 61-78. <https://doi.org/10.1111/tpj.13468>.
- Ullah A, Sun H, Yang X, Zhang X. (2017) Drought coping strategies in cotton: Increased crop per drop. *Plant Biotechnology Journal*. 15(3): 271-284. <https://doi.org/10.1111/pbi.12647>.
- Varet H, Brillet-Guéguen L, Coppée JY, Dillies MA. (2016) SARTools: A DESeq2- and EdgeR-based R pipeline for comprehensive differential analysis of RNA-Seq data. *PLOS ONE*. 11(6): e0157022.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157022>.

Wang Z, Zhang Y, Huang Z, Huang L. (2008) Antioxidative response of metal-accumulator and non-accumulator plants under cadmium stress. *Plant and Soil*. 310(1-2): 137-149. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9641-1>.

Wang M, Tu L, Yuan D, Zhu D, Shen C, Li J, Liu F, Pei L, Wang P, Zhao G, Ye Z, Huang H, Yan F, Ma Y, Zhang L, Liu M, You J, Yang Y, Liu Z, Zhang X. (2019) Reference genome sequences of two cultivated allotetraploid cottons, *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*. *Nature Genetics*. 51(2): 224-229. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0282-x>.

Xiong H, He H, Chang Y, Miao B, Liu Z, Wang Q, Dong F, Xiong L. (2025) Multiple roles of NAC transcription factors in plant development and stress responses. *Journal of Integrative Plant Biology*. 67(3): 510-538. <https://doi.org/10.1111/jipb.13854>.

Yu LH, Wu SJ, Peng YS, Liu RN, Chen X, Zhao P, Xu P, Zhu JB, Jiao GL, Pei Y, Xiang CB. (2016) *Arabidopsis* *EDT1/HDG11* improves drought and salt tolerance in cotton and poplar and increases cotton yield in the field. *Plant Biotechnology Journal*. 14(1): 72-84. <https://doi.org/10.1111/pbi.12358>.

Zafar MM, Chattha WS, Khan AI, Zafar S, Subhan M, Saleem H, Ali A, Ijaz A, Anwar Z, Qiao F, Shakeel A, Seleiman MF, Wasonga DO, Parvaiz A, Razzaq A, Jiang X. (2023) Drought and heat stress on cotton genotypes suggested agro-physiological and biochemical features for climate resilience. *Frontiers in Plant Science*. 14: 1265789. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1265789>.

Zhong X, Han A, Liusui Y, Zhang X, Fu W, Wang Z, Li Y, Cao J, Guo Y, Zhang J. (2025) Identification of key pathways and genes underlying melatonin-enhanced drought tolerance in cotton. *PeerJ*. 13: e20005. <https://doi.org/10.7717/peerj.20005>.

Zhu G, Wang S, Huang Z, Zhang S, Liao Q, Zhang C, Lin T, Qin M, Peng M, Yang C, Cao X, Han X, Wang X, van der Knaap E, Zhang Z, Cui X, Klee H, Fernie AR, Luo J, Huang S. (2018) Rewiring of the fruit metabolome in tomato breeding. *Cell*. 172(1-2): 249-261.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.019>.

"دالوند و همکاران، عنوان: تحلیل یکپارچه فیزیولوژی و ترنسکریپتوم برای شناسایی سازوکارهای تحمل ..."

Integrated Physiological and Transcriptomic Analyses Reveal Mechanisms of Drought Tolerance in Cotton (*Gossypium* spp.): Omics-Driven Approaches for Sustainable Agriculture

Yadollah Dalvand¹, Mojtaba Khayyam Nakoei^{2*}, Abdolreza Jafari^{1*}, Rasmiyeh
Hamid³, Mohammadreza Ghaffari^{4, 5}

1. Molecular Genetics Department, Arsanjan Branch, Islamic Azad University, Arsanjan, Iran

2. Department of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3. Plant Breeding Research Group, Cotton Research Institute, Agricultural Research, Education and
Extension Organization, Golestan, Iran

4. Bioinformatics and Artificial Intelligence Research Group, Agricultural Biotechnology Research
Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

5. Systems Biology Research Group, Agricultural Biotechnology Research Institute, Agricultural
Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

mojtabakhayam@gmail.com

Abstract

Drought stress limits cotton yield in arid regions by disrupting physiological and molecular processes. This study examined two genotypes: GISV-328 (sensitive) and G. Cot 16 (tolerant) using phenotypic, physiological, and transcriptomic data. Under water deficit, the tolerant genotype better maintained water status, membrane stability, photosynthetic efficiency, and osmotic adjustment, while the sensitive genotype showed greater oxidative damage. RNA-Seq identified 1,465 differentially expressed genes enriched in hormone signaling (especially ABA), MAPK cascades, amino acid/carbohydrate metabolism, secondary metabolite biosynthesis, and antioxidant responses. Key transcription factors (NAC, WRKY, bHLH, DREB) and stress-related genes (HSPs, LEA) were upregulated, indicating complex regulatory networks. The tolerant genotype exhibited stronger activation of osmotic regulation, antioxidant defense, and energy metabolism, whereas the sensitive genotype showed mostly structural and limited responses. Convergence of calcium, ABA, and ROS signals emerged as a core regulatory hub. Overall, drought tolerance in cotton results from coordinated interplay among signaling, transcriptional, and metabolic pathways that preserve cellular homeostasis and enhance adaptation to water scarcity.

Keywords: Cotton, Transcriptome, Drought stress, Hormone signaling, Transcription factors