علوم و تحقیقات بذر ایران
سال دوازدهم/ شماره اول/ ۱۴۰۴ (۸۹ - ۷۷)
مقاله پژوهشی
DOI: 10.22124/jms.2025.8931

غربال‌گری ژنوتیپ‌های برنج (*Oryza sativa*.L) تحت تنش خشکی در مرحله جوانه‌زنی و معرفی ژن‌های کلیدی در پاسخ به تنش

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۳/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۴/۲۳

چکیده

تنش‌های محیطی مانند خشکی، شوری، گرما تهدیدی جدی برای کشاورزی بحساب می‌آیند. تنش خشکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی در برنج است که باعث کاهش عملکرد محصول می‌شود. در این پژوهش، ۱۲ ژنوتیپ بومی برنج (*Oryza sativa* L.) برای ارزیابی تحمل به تنش خشکی در مرحله جوانه‌زنی بررسی شدند. تنش اسمزی با استفاده از پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG6000) در چهار سطح (۰، ۱۰، ۱۵، ۲۰ درصد) اعمال گردید. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل با سه تکرار اجرا شده و صفات مورفولوژیک نظیر طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، وزن تر و خشک، درصد جوانه‌زنی، شاخص بنیه بذر و ضریب آلومتریک مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد اثر ژنوتیپ، سطح تنش و تعامل آن‌ها بر اغلب صفات معنی‌دار است. با استفاده از نتایج تجزیه به عامل‌ها بر اساس مولفه‌های ضریب آلومتریک و شاخص بنیه بذر، ژنوتیپ «سپیدرود» متحمل‌ترین و «علی کاظمی» حساس‌ترین ژنوتیپ به تنش خشکی در مرحله جوانه زنی شناسایی شدند. در تحلیل‌های بیوانفورماتیکی نیز داده‌های ترانسکریپتومی موجود در پایگاه داده که شامل دو ژنوتیپ متحمل و حساس به تنش خشکی بود، تجزیه و تحلیل شد و تعدادی ژن‌های کلیدی از جمله DREB2A، CSD2، ANNAT، AOC2 شناسایی شدند. تحلیل غنی‌سازی ژن‌ها نشان داد فرآیندهای متابولیکی و مسیرهای مرتبط با استرس اکسیداتیو و تنظیم اسمزی در پاسخ به تنش خشکی فعال شده‌اند. نتایج این مطالعه می‌تواند در انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل و راهکارهای به‌نژادی آینده مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: خشکی، *Oryza sativa*، شاخص‌های تحمل، صفات مورفولوژیک، هم‌بیانی ژن

۱- دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. sshojaee8@gmail.com
۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir
۳- دانش‌آموخته دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه گیلان و پژوهشگر واحد فناور زیست رادان موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی شمال کشور، رشت، ایران. Pasandide.m92@gmail.com
۴- استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. hsamizadeh@guilan.ac.ir
*نویسنده مسئول: mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir

مقدمه

با وجود پیشرفت‌های کشاورزی، به دلیل رشد جمعیت و محدودیت منابع خاک و آب، کمبود غذا و تغذیه مناسب همچنان اصلی‌ترین شکل فقر جهانی است (Susilastuti, 2018). برنج، یکی از غذاهای اصلی مردم جهان می‌باشد. سالانه حدود ۱۶۵ میلیون هکتار از اراضی جهان تحت کشت برنج است که متوسط عملکرد آن به حدود ۴/۷ تن در هکتار می‌رسد. همچنین، در سال زراعی ۱۴۰۲-۱۴۰۱، حدود ۷۹۲ هزار هکتار از اراضی کشور تحت کشت برنج قرار گرفت. جوانه‌زنی بذر با جذب آب توسط بذر خشک آغاز شده و با رشد جنین و خروج ریشه‌چه، که نشان‌دهنده تکمیل فرایند جوانه‌زنی است، به پایان می‌رسد (Foschi *et al*., 2023). خشکی می‌تواند روی جنبه‌های مختلف جوانه‌زنی مانند قدرت جذب آب، درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی (An *et al*., 2011)، میانگین زمان جوانه‌زنی بذر، قدرت جوانه‌زنی و بنیه بذر (Boydak *et al*., 2003) تاثیر منفی بگذارد. ارزیابی ژنوتیپ‌ها معمولا بر اساس نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی، سیتوژنتیکی و مولکولی انجام می‌گیرد. استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی به دلیل سهولت و کم هزینه بودن در ارزیابی‌های مقدماتی مناسب بوده و می‌توانند به عنوان رویکردی عمومی در بررسی تنوع ژنتیکی بین توده‌ها استفاده گردند (Pour, Kh. *et al*., 2020). در زمان رویارویی با تنش، گیاهان از مکانیسم‌های متفاوتی جهت جاروب گونه‌های اکسیژن فعال و حفاظت خود در برابر اثرات منفی تنش استفاده می‌کنند (Ahmadi *et al*., 2018). میزان تحمل به تنش‌های محیطی در مراحل مختلف رشد برنج از جوانه‌زنی تا رسیدن کامل متفاوت است، به طوری که مشخص شده‌است مرحله گیاهچه‌ای از مراحل حساس به تنش خشکی است و داشتن کلئوپتیل طویل سبب بهبود وضعیت استقرار گیاهچه‌ها می‌شود که از عوامل اصلی در تولید نهایی گیاه محسوب می‌شود (Balouchi, 2010). از آنجا که ایجاد و حفظ پتانسیل آب لازم در محیط خاک، جهت بررسی واکنش گیاهان به تنش خشکی مشکل است، شبیه‌سازی شرایط تنش با استفاده از مواد اسموتیک نظیر پلی‌اتیلن گلیکول (PEG)[1] برای ایجاد پتانسیل‌های اسمزی مطالعه تاثیر تنش بر خصوصیات گیاهچه‌ها بسیار متداول است (Afiukwa *et al*., 2016). PEG، به دلیل وزن مولکولی بالا و عدم ورود به سلول، ابزاری مناسب برای ایجاد تنش اسمزی بدون آسیب مستقیم به ساختار سلولی گیاه است (Michel and Kaufmann, 1973). در این پژوهش با استفاده از PEG در غلظت‌های مختلف (Chen *et al*., 2021) و ایجاد تنش خشکی مصنوعی و اثرات آن بر پارامترهای مورفولوژیک گیاه برنج پرداخته شده است. به منظور ارتقا تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی و افزایش بهره‌وری، تحقیقات علمی به طور فزاینده‌ای بر درک اهداف مولکولی کلیدی، تنظیم‌کننده‌ها و مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط با تعاملات گیاهان با محیط‌های تغییر یافته متمرکز شده‌است (Kholghi *et al*., 2024). فناوری‌های اُمیکس (ترنسکریپتومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس) درک پاسخ گیاهان به تنش‌های غیرزیستی را بهبود بخشیده‌اند. این روش‌ها با تحلیل هم‌زمان بیان ژن‌ها، پروتئین‌ها و متابولیت‌ها، شناسایی شبکه‌های مولکولی مرتبط با پاسخ‌های تنشی را تسهیل کرده و امکان مطالعه جامع مکانیسم‌های مقاومت گیاهان را فراهم می‌کنند (Pandey *et al*., 2024). در سال‌های اخیر مطالعات در زمینه میزان تنوع ژنتیکی تحمل به تنش خشکی در مرحله جوانه زنی در گیاهان مختلف در حال انجام می‌باشد. اینگونه مطالعات می‌تواند منجر به راهکارهایی برای غربال سریع ارقام گردد. اگر بتوان ژنوتیپ را به طور همزمان براساس همه شاخص‌ها و متغیرها ارزیابی و انتخاب نمود، احتمال موفقیت در گزینش افزایش می یابد. یکی از روش‌های بسیار کارآمد برای کاهش ابعاد داده ها و خلاصه کردن تغییرات آنها در تعداد کمی مؤلفه روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی می باشد. با توجه به کاهش میزان آب و از آنجائکه برنج در شمال کشور سطح زیرکشت نسبتًا بالایی را به خود اختصاص داده است، شناسایی ارقام برتر از نظر تحمل به خشکی در مرحله جوانه‌زنی از اهمیت بسزایی برخوردار است. این پژوهش به‌منظور ارزیابی واکنش ارقام برنج به تنش خشکی در مرحله جوانه زنی و شناسایی ارقام متحمل با بهره گیری از روش‌های پیشرفته آماری انجام شد. تنش‌های محیطی سالانه سبب کاهش شدید عملکرد گیاهان می‌شود. شناسایی ژن‌های موثر در سطوح مختلف تنش خشکی در

[1] Poly Ethylene Glycol (PEG 6000)

گیاه برنج می‌تواند در یافتن ژن‌های موثر در تحمل گیاه به تنش‌های محیطی بسیار مهم باشد. اطلاعات به دست آمده از تحلیل داده‌های زیستی به وسیله علم بیوانفورماتیک، در به خط کردن توالی ها در بانک‌های اطلاعاتی برای یافتن شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنی، پیش گویی ساختار و عملکرد محصولات ژن‌ها و یافتن ارتباط فیلوژنتیک میان ژن‌ها و توالی‌های پروتئینی کمک می‌کند (Hadizadeh *et al*. 2013; Hadizadeh *et al*. 2014). از این رو در این مطالعه با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی ژن‌های بسیار مهم و موثر در تنش خشکی به عنوان ژن‌های کلیدی جهت استفاده در برنامه‌های به‌نژادی گیاهان در تحمل به تنش-های محیطی معرفی خواهد شد.

مواد و روش‌ها

به منظور تعیین میزان تحمل به تنش اسمزی در برنج و تعیین ژنوتیپ‌های متحمل و حساس در سال ۱۴۰۳، ۱۲ ژنوتیپ برنج از موسسه‌ی تحقیقاتی برنج کشور (RRII[۲]) تهیه (جدول ۱) و مولفه‌های جوانه‌زنی آن‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. آزمایش با در نظر گرفتن دو عامل ژنوتیپ و ۴ سطح تنش اسمزی در قالب یک طرح کاملا تصادفی در سه تکرار اجرا شد. سطوح تنش اسمزی شامل صفر (آب مقطر)، ۱۰٪ (۱/۴۸- بار)، ۱۵٪(۲/۹۵- بار)، ۲۰٪ (۴/۹۱- بار) توسط PEG ۶۰۰۰ ایجاد شد. برای انجام آزمایش، ابتدا بذرها با مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۲/۵٪ هیپوکلریت سدیم ضدعفونی و سپس با آب مقطر شستشو داده‌شدند. سپس در هر پتری‌دیش ۱۰سانتی‌متری حاوی کاغذ صافی استریل، تعداد ۲۵ عدد بذر قرار داده و به هر کدام مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از محلول‌های دارای غلظت‌های مختلف PEG اضافه و به مدت ۷ روز در داخل انکوباتور در در دمای ۲۵ درجه سیلسیوس و رطوبت ۷۰٪ و در شرایط تاریکی قرار گرفتند. در این آزمایش صفات درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی، سرعت رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، شاخص طولی و وزنی بنیه بذر، طول گیاهچه، وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه و ضریب آلومتری اندازه‌گیری شدند. شمارش بذرهای جوانه‌زده به صورت روزانه و در ساعت ۱۱ صبح انجام شد. همچنین خروج ریشه‌چه به اندازه دو میلی‌متر یا بیشتر به عنوان معیار جوانه‌زنی در نظر گرفته شد (Bewley and Black, 2012). زمانی که پس از گذشت ۲۴ ساعت هیچ بذری جوانه نزد، بعنوان پایان جوانه‌زنی در نظرگرفته شد.

اندازه‌گیری طول ساقه‌چه و ریشه‌چه : طول ساقه‌چه و ریشه‌چه با استفاده از نرم افزار Imagej با واحد سانتی‌متر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری وزن تر و خشک گیاهچه: در پایان روز چهاردهم و اتمام اندازه‌گیری طول ریشه‌چه و ساقه‌چه بذرها، ریشه‌چه و ساقه‌چه ۵ گیاه به تصادف انتخاب و توسط قیچی جدا و وزن تر آن‌ها به صورت جداگانه توسط ترازو دیجیتال با دقت ۰۰۰۱/ گرم اندازه‌گیری شده و سپس برای محاسبه وزن خشک، هر کدام از آن‌ها جداگانه در داخل فویل پیچیده و به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۸۰ درجه سیلسیوس قرار گرفتند.

ضریب آلومتریک[۳] : ضریب آلومتری بیانگر رابطه کمی بین رشد اندام‌های مختلف گیاه است و اغلب برای توصیف نحوه تخصیص ماده خشک بین ریشه و اندام هوایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این رابطه به‌صورت معادله زیر ارائه می‌شود.

$$\text{ضریب آلومتری} = \frac{\text{طول ساقه‌چه}}{\text{طول ریشه‌چه}} \qquad \text{(رابطه ۱)}$$

درصد جوانه‌زنی[۴] : این شاخص بیانگر نسبت بذرهای جوانه‌زده به کل بذرهای کشت‌شده بوده مطابق فرمول زیر محاسبه می‌گردد.

$$\text{درصد جوانه‌زنی} = \frac{\text{تعداد بذر جوانه زده}}{\text{تعداد کل بذرها}} \times 100 \qquad \text{(رابطه ۲)}$$

میانگین جوانه‌زنی روزانه[۵] : میانگین جوانه‌زنی روزانه، شاخصی برای سنجش سرعت جوانه‌زنی است و از تقسیم درصد جوانه‌زنی بر تعداد روزهای دوره جوانه‌زنی به‌دست می‌آید (Hunter *et al*., 1984).

$$\text{میانگین جوانه‌زنی روزانه} = \frac{\text{درصد جوانه‌زنی}}{\text{طول دوره جوانه‌زنی}} \qquad \text{(رابطه ۳)}$$

شاخص بنیه گیاهچه[۶] : این شاخص از حاصل‌ضرب درصد جوانه‌زنی در مجموع طول ریشه‌چه و ساقه‌چه به‌دست می‌آید (Amin Deldar et al., 2015).

[2]Rice Research Institute
[3]Allometric Coefficient
[4]Germination Percent
[5]Mean Daily Germination
[6] Seedling Vigor Index

(رابطه ۴) درصد جوانه‌زنی × (طول ساقه‌چه + طول ریشه‌چه) = شاخص بنیه گیاهچه

درصد آب بافت[7] : درصد آب بافت نشان‌دهنده نسبت آب موجود در بافت گیاه به وزن تر آن است و معمولاً به‌صورت زیر محاسبه می‌شود که در آن FW وزن تر و DW وزن خشک بافت است.

(رابطه ۵) $$W=\frac{FW-DW}{FW}\times 100$$

تجزیه آماری صفات مورفولوژیک : برای بررسی اختلافات معنی‌دار بین ژنوتیپ‌های برنج و اثر متقابل ژنوتیپ و تنش خشکی بر صفات مورد مطالعه، تجزیه واریانس در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل و سه تکرار انجام شد. تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS v.9 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۱٪ صورت گرفت. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از SPSSنسخه ۲۲ انجام شد و مؤلفه‌ها بر اساس صفات با بالاترین ضرایب عاملی نام‌گذاری شدند. برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها، نمودار پراکنش دوبعدی بر اساس مؤلفه‌های اول و دوم رسم شد، که موقعیت ژنوتیپ‌ها در محورهای مختصات مشخص و لاین‌های مناسب بر اساس این موقعیت‌ها شناسایی شدند.

جدول ۱– خصوصیات ژنوتیپ‌های برنج مورد ارزیابی

Table 1. Characteristics of Evaluated Rice Genotypes

شماره Number	ژنوتیپ‌های برنج Rice genotypes	منشا Origin
1	شاهپسند Shahpasand	مازندران Mazandaran
2	غریب‌سیاه ریحانی Gharibesyah-reihani	گیلان Guilan
3	نیپونبره Nipponbereh	ژاپن Japan
4	گرده Gerdeh	گیلان Guilan
5	سنگ‌جو Sangejo	مازندران Mazandaran
6	سپیدرود Sepidrod	گیلان Guilan
7	طارم محلی Tarom mahali	مازندران Mazandaran
8	هاشمی Hashemi	گیلان Guilan
9	علی کاظمی Ali Kazemi	گیلان Guilan
10	شیرودی Shirodi	مازندران Mazandaran
11	هستی Hasti	گیلان Guilan
12	کیان Kian	گیلان Guilan

مطالعات بیوانفورماتیکی: برای انجام این مطالعه از آنالیز داده‌های میکروواری گیاه برنج که در سایت Expression Atlas (https://www.ebi.ac.uk/gxa/experiments) استفاده شد. پس از آنالیز داده‌ها، ژن‌های شناسایی و داده‌های بیانی رقم حساس و متحمل گیاه برنج به تنش خشکی به طور جداگانه با Adjust p-value کمتر از ۰/۰۵ و LogFC (Log of Fold Change) بزرگتر و مساوی دو به عنوان ژن‌های تفرق بیان یافته انتخاب شدند. سپس با استفاده از ابزار VENNY (https://jvenn.toulouse.inrae.fr/app/example.html) ژن‌های مشترک در دو ژنوتیپ حساس و متحمل مشخص شدند. از آنجایی که به‌نژادی گیاهان متحمل به تنش حائز اهمیت می‌باشد، برای شناسایی ژن‌های کلیدی پاسخ دهنده به خشکی ژن‌هایی که فقط در ژنوتیپ متحمل بیان شده بودند با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape (نسخه ۳. ۹. ۱) و پلاگین CytoHubba توسط روش MCC (Maximal clique centrality) شناسایی شد. MCC یک روش تحلیل توپولوژیکی است که به شناسایی ژن‌های کلیدی و زیرشبکه‌ها کمک می‌کند. این متریک بر اساس نظریه گراف عمل کرده و بر شناسایی نواحی با اتصال بالا تمرکز دارد که اغلب با ماژول‌های عملکردی مهم مانند کمپلکس‌های پروتئینی یا مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط هستند (Li *et al*., 2020). بررسی فرآیندهای بیولوژیکی ژن‌های کلیدی و مسیرهای ژن‌های تفرق بیان یافته با استفاده از ابزار DAVID (v2023q4) (https://david.ncifcrf.gov) انجام شد. به منظور

[7] Tissue Water Content

شناسایی ژن‌های هم‌بیان[8]، ژن‌های کلیدی از سایت genemania (https://genemania.org/) استفاده شد.

نتایج و بحث

انتخاب ژنوتیپ متحمل و حساس: به‌منظور بررسی تأثیر ژنوتیپ، تنش خشکی و اثر متقابل آن‌ها بر ویژگی‌های مورفولوژیک گیاهچه، تجزیه واریانس داده‌ها برای ده صفت مختلف انجام گرفت. نتایج حاصل از میانگین مربعات نشان داد که تأثیر ژنوتیپ، خشکی و برهم‌کنش آن‌ها (ژنوتیپ در خشکی) بر اغلب صفات مورد بررسی از نظر آماری معنی‌دار بود. این نتایج نشان می‌دهد که تفاوت‌های ژنتیکی و شرایط محیطی می‌توانند به‌طور قابل توجهی بر صفات بیومتریکی ریشه و ساقه گیاهچه برنج تأثیرگذار باشند. هم‌چنین اثرات متقابل ژنوتیپ×تنش در بسیاری از صفات بیانگر آن است که واکنش ژنوتیپ‌ها به خشکی متفاوت بوده است (جدول ۲).

جدول۲- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی

Table 2. Analysis of Variance Results for the Studied Traits

منابع تغییرات Sources of change	درجه آزادی df	طول ریشه‌چه Radicle length	طول ساقه‌چه Shoot length	وزن تر ریشه‌چه Fresh weight of radicle	وزن خشک ریشه‌چه Radicle dry weight	وزن تر ساقه‌چه Shoot fresh weight	وزن خشک ساقه‌چه Shoot dry weight	درصد جوانه‌زنی Germination percentage	شاخص بنیه گیاهچه Seedling vigor index	ضریب آلومتریک Allometric coefficient
ژنوتیپ Genotype	11	14.61**	5.21**	0.009**	0.0001**	0.006**	0.0001**	2748**	451577.001**	1.54**
خشکی Drought	3	122.42**	55.74**	0.019**	0.0002**	.11**	0.001**	10792.44**	3008801.73**	5.43**
ژنوتیپ در خشکی Genotype×Drought	33	4.88**	1.32**	0.0019**	0.00003**	0.003**	0.00009**	1153.73**	76464.93**	2.96**
خطای آزمایشی Error	96	0.08	0.06	0.0002	0.000002	0.0001	0.00001	64.22	4496.97	0.08
ضریب تغییرات C.V		7.18	9.86	22.98	14.17	12.79	22.87	9.95	11.2	18.02

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد

** indicating the significant differences at 1 percent probability level

به‌منظور بررسی دقیق‌تر تفاوت میان ژنوتیپ‌ها از نظر صفات طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، وزن تر ریشه‌چه و ساقه‌چه و وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه آزمون چنددامنه‌ای توکی[9] در سطح احتمال ۱ درصد انجام گرفت. نتایج حاکی از وجود تنوع ژنتیکی قابل توجه میان ژنوتیپ‌ها در صفات رشد اولیه و جوانه‌زنی است که می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرد. مطالعات نشان دادند که در صورت وقوع تنش شوری و خشکی جوانه‌زنی و متعاقب با آن رشد گیاهچه به شدت کاهش می‌یابد. کاهش فعالیت آمیلاز در بذرهای گیاهان درشرایط تنش باعث می‌شود تشکیل گلوکز از نشاسته کاسته شود که نتیجه آن کاهش ساخته شدن ساکارز بوده و نهایتا منجر به محدود شدن محور جنین‌زا و محدودیت رشد گیاهچه تحت تنش می‌شود (Maleki *et al*., 2024). نتایج به دست آمده کاملا همسو با نتایج مطالعات پیشین بوده است و با شدت سطح تنش درصد جوانه‌زنی کاهش معنی‌داری داشته‌است. شرایط تنش خشکی با ایجاد تاخیر در فرآیند جذب آب بذر، باعث کاهش نرخ جوانه‌زنی بذر شده و در نهایت درصد جوانه‌زنی و بنیه گیاهچه را کاهش می‌دهد (Zamani *et al*., 2018)، نتایج به دست آمده در این پژوهش نیز نشان داد با افزایش سطح تنش شاخص بنیه بذر کاهش یافت نسبت طول ریشه‌چه به طول ساقه‌چه به‌عنوان یکی از شاخص‌های مهم فیزیولوژیکی، بیانگر مکانیزمی از تحمل گیاه نسبت به تنش‌های محیطی محسوب می‌شود. اگرچه این نسبت عمدتاً تحت تأثیر عوامل ژنتیکی قرار دارد، اما شرایط محیطی نیز می‌توانند تا حدودی آن را تعدیل کنند. در مطالعه‌ای که به بررسی اجزای جوانه‌زنی بذر کلزا و ماشک تحت شرایط تنش شوری پرداخته شد، مشخص گردید که شوری تأثیر معناداری بر ضریب آلومتریک دارد؛ به‌طوری‌که با افزایش سطوح تنش شوری، مقدار این ضریب کاهش یافت (Mohsenzadeh Golfazani *et al*., 2020).

بر اساس نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، تعداد سه مؤلفه اصلی و مستقل با مقادیر ویژه بیش از یک استخراج شدند. این مؤلفه‌ها پس از چرخش توانستند ۸۱/۱۰ درصد از تنوع کل داده‌ها را توجیه نمایند. واریانس مشترک مؤلفه‌ها، بار مؤلفه‌های دوران‌یافته، واریانس توجیهی هر

[8]Co-expression network

[9]Tukey's HSD

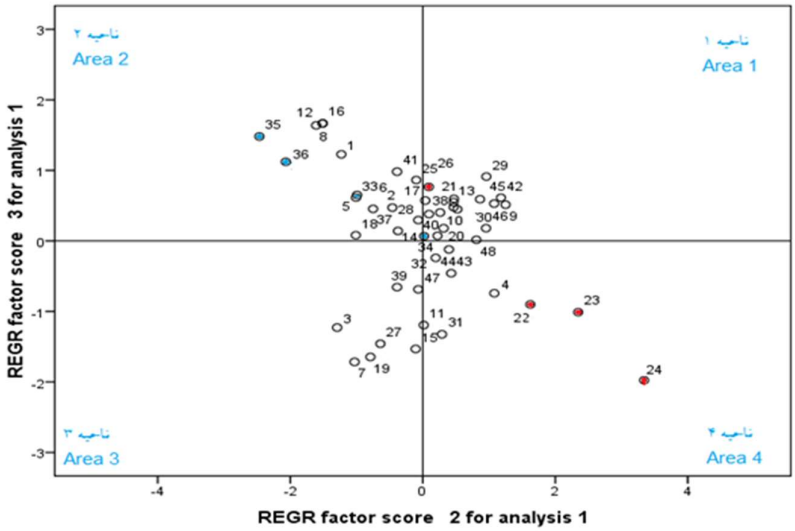
مؤلفه، واریانس تجمعی توجیه شده و ریشه مشخصه حاصل از تجزیه به مؤلفه‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است. بالا بودن واریانس مشترک اکثر صفات نشان‌دهنده انتخاب مناسب تعداد مؤلفه‌ها می‌باشد، زیرا واریانس مشترک در حقیقت قسمتی از واریانس یک متغیر است که به مؤلفه‌های مشترک مرتبط می‌باشد و بالا بودن آن، دقت بالای برآورد واریانس متغیر را نمایش می‌دهد. به‌طور کلی در این ارزیابی، صفات با ضرایب مؤلفه بالای ۰/۵ به‌عنوان ضرایب معنی‌دار و مؤثر در مدل در نظر گرفته شدند. در مؤلفه اول، صفات طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، وزن تر و خشک ریشه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه و درصد جوانه‌زنی ضرایب بالایی داشتند، که نشان‌دهنده تنوع بالای این صفات و اهمیت آن‌ها برای انتخاب ژنوتیپ‌های برتر است. مؤلفه دوم با تمرکز بر وزن تر ریشه‌چه و ضریب آلومتریک، برای گزینش لاین‌های متحمل مناسب تشخیص داده شد. مؤلفه سوم به شاخص بنیه بذر و درصد جوانه‌زنی مرتبط بود. از تجزیه به مولفه‌های اصلی علاوه بر شناسایی صفات کلیدی، برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و تحلیل همبستگی صفات نیز می‌توان استفاده کرد.

جدول ۳- نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی برای کلیه صفات در تیمارهای مختلف برنج

Table 3. Result of principal component analysis for all characteristics in different treatments of rice

		components مولفه‌ها			
Characteristics	صفات	1	2	3	واریانس مشترک Communality
Radicle in the Third measure	طول ریشه‌چه	.692	.327	.467	.804
Shoot in the first measure	طول ساقه‌چه	.847	.106	.416	.901
The fresh weight radicle	وزن تر ریشه‌چه	.562	.692	.170	.824
The fresh weight shoot	وزن تر ساقه‌چه	.745	.381	-.181	.733
Dry weight radicle	وزن خشک ریشه‌چه	.870	.074	.290	.847
Dry weight shoot	وزن خشک ساقه‌چه	.897	-.061	.011	.809
Germination percentage	درصد جوانه زنی	.826	.222	-.111	.743
Vigor index	شاخص بنیه	-.067	.042	-.961	.931
Allometric index	ضریب آلومتریک	-.138	.799	-.091	.665

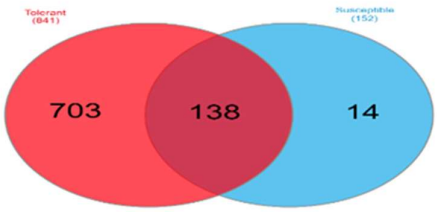
پراکنش دوگانه بر اساس مؤلفه‌های دوم (ضریب آلومتریک) و سوم (شاخص بنیه بذر) در شکل ۱ ارائه شده است. از آنجایی که مقادیر پایین صفات مربوط به ضریب آلومتریک و مقادیر بالا ریشه‌چه مطلوب محسوب شده، بنابراین ناحیه مطلوب ناحیه چهارم خواهد بود و تیمارهای مربوط ژنوتیپ‌های که در این ناحیه قرار دارند، ژنوتیپ‌های با عکس العمل مطلوب نسبت به تنش خشکی می‌باشند و می‌توان آنها را به عنوان ژنوتیپ متحمل در مرحله جوانی‌زنی معرفی نمود و ژنوتیپ‌های مربوط به تیمارهای موجود در ناحیه دوم از نظر عکس العمل به تنش خشکی ضعیف‌ترین ژنوتیپ‌ها و در ناحیه نامطلوب قرار داشتند. قرار گرفتن تیمارهای ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد PEG برای ژنوتیپ سپیدرود (شماره‌های ۲۲، ۲۳ و ۲۴ که با رنگ قرمز نشان داده شده)، در ناحیه چهارم نشان دهنده ژنوتیپ متحمل در مرحله جوانه‌زنی در این پژوهش بود و تیمار ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد برای ژنوتیپ علی کاظمی در ناحیه دوم به عنوان ژنونتیپ حساس بود و از لحاظ صفات مورد ارزیابی دارای کمترین مقدار درصد جوانه زنی و بالاترین مقدار ضریب آلومتریک بود. استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و ترسیم دیاگرام پراکنش در مطالعات دیگر نیز به منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها تحت شرایط تنش گزارش شده است (Farshadfar, Zamani, Motallebi, and Imamjomeh, 2001; Golabadi, Arzani, and Maibody, 2006; Jajarmi, 2009). این تفاوت‌ها می‌تواند مبنای مناسبی برای برنامه‌های اصلاحی جهت بهبود تحمل به خشکی در مراحل ابتدایی رشد برنج را فراهم سازد.



شکل ۱- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی تیمارهای برنج بر اساس مؤلفه‌های دوم و سوم

Figure1. Scatter plot of rice based on second and third factors in factor analysis method

شناسایی بیوانفورماتیکی ژن‌های پاسخ دهنده به تنش خشکی در ارقام متحمل و حساس برنج: در بررسی‌های بیوانفورماتیکی انجام شده روی داده‌های آنالیز شده ریز آرایه گیاه برنج موجود در پایگاه داده که این داده ها مربوط ارقام متحمل (Dagad deshi) و حساس (IR20) برنج بود که در شرایط هیدروپونیک در محیط کشت یوشیدا به مدت ۷ روز در دمای ۱±۲۸ کشت شده‌بودند و در مرحله جوانه‌زنی (هفت روزگی) به مدت شش ساعت تحت تنش خشکی توسط پلی‌اتیلن‌گلیکول 6000 (PEG) قرار گرفته بودند؛ ۷۰۳ ژن در رقم متحمل، ۱۴ ژن در رقم حساس و ۱۳۸ ژن در هر دو رقم متحمل و حساس تغییر بیان معنی‌داری را از خود نشان دادند (شکل ۲).



شکل۲- نمودار ون ژن‌های تفرق بیان یافته در ژنوتیپ متحمل (قرمز) و حساس (آبی) گیاه برنج تحت تنش خشکی در مرحله جوانه‌زنی

Figure 2. Venn diagram of differentially expressed genes in tolerant (red) and susceptible (blue) genotypes of rice plants under drought stress at the germination stage

معرفی ژن‌های کلیدی : ژن‌های کلیدی شناسایی شده در این پژوهش شامل *ATS1*، *ANNAT*، *AOC2*، *MAPK7*، *DREB2A*، *ERS2*، *CSD2* و *NAC017* می‌باشند (جدول ۴). ژن‌های خانواده پراکسیداز[10] و همچنین ژن‌های مرتبط با پراکسیدازهای خاص مانند پرواکسیژناز[11]، نقش مهمی در تحمل به تنش‌های محیطی از جمله خشکی در گیاهان ایفا می‌کنند مطالعه‌ای نشان داده است که ژن کلاس III پراکسیداز *OsPrx114* در برنج تحت شرایط

[10]Peroxidase

[11]Peroxygenase

تنش خشکی و PEG القا می‌شود .این ژن با کاهش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند پراکسیداز و کاتالاز، تحمل به خشکی را افزایش می‌دهد .همچنین، فاکتور رونویسی OsWRKY50با اتصال به ناحیه پروموتر OsPrx114 ، بیان آن را تنظیم می‌کند (Zheng *et al*., 2023) . در آرابیدوپسیس، ژن‌های خانواده *CLO/PXG* مانند *AtCLO3* و *AtCLO4* در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، شوری و سرما تنظیم می‌شوند .بیان بیش از حد *AtCLO4* منجر به افزایش تحمل به این تنش‌ها شده است، در حالی که جهش در این ژن‌ها حساسیت به تنش را افزایش داده است (Hanano *et al*., 2023) . ژن‌های خانواده *Annexin* نقش مهمی در تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی از جمله خشکی ایفا می‌کنند. مطالعه‌ای نشان داده است که بیان بیش از حد ژن *AnnSp2* در گوجه‌فرنگی منجر به افزایش تحمل به خشکی و شوری می‌شود .این ژن با تنظیم سنتز اسید آبسزیک (ABA) و حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ، نقش مهمی در پاسخ به تنش ایفا می‌کند (Ijaz *et al*., 2017) . در برنج، ژن *OsANN1* با تنظیم تجمع آنتی‌اکسیدان‌ها تحت تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی و گرما، تحمل به این تنش‌ها را افزایش می‌دهد. بیان بیش از حد این ژن منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز (*SOD*) و کاتالاز (*CAT*) شده است (Qiao *et al*., 2015) یکی دیگر از ژن‌های کلیدی شناسایی شده، ژن *Allene Oxide Cyclase* (*AOC*) می‌باشد که نقش مهمی در مسیر بیوسنتز اسید جاسمونیک (JA) دارد که یکی از هورمون‌های کلیدی در پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی از جمله خشکی است (Stenzel *et al*., 2012) در مطالعه‌ای به روی نیشکر، ژن *ScAOC1*شناسایی و کلون شد. نتایج نشان داد که بیان این ژن تحت تنش‌های مختلفی مانند خشکی با استفاده از (PEG)، شوری(NaCl) ، سرما و اسید آبسزیک (ABA) افزایش می‌یابد.

هم‌چنین، بیان موقتی *ScAOC1* در برگ‌های *Nicotiana benthamiana* باعث افزایش تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی شد (Sun *et al*., 2020). ژن *MAPK5* و اعضای مرتبط با آن در مسیر سیگنال‌دهی *MAPK*نقش مهمی در افزایش تحمل گیاهان به تنش خشکی دارند. در سیب‌زمینی، ژن *StMAPKK5* به‌عنوان یکی از اجزای مسیر سیگنال‌دهی*MAPK*، نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های خشکی و شوری ایفا می‌کند. بیان بیش از حد این ژن منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و بهبود وضعیت فیزیولوژیکی گیاه تحت شرایط تنش می‌شود. همچنین، پروتئین‌های متعددی با *StMAPKK5*تعامل دارند که در تنظیم پاسخ‌های گیاه به تنش نقش دارند (Luo *et al*., 2024).

شبکه هم‌بیانی: روابط هم بیانی در قالب تصویر ارائه‌شده در شکل ۳ نشان‌داده‌شده است. در این نوع نمودار، هر گره[12] نشان‌دهنده یک ژن است و هر یال[13] نشان‌دهنده ارتباط آماری یا بیولوژیکی بین دو ژن از نظر هم‌بیان

جدول ۴- ژن‌های کلیدی شناسایی شده با استفاده از نرم‌افزار سایتواسکیپ در ژنوتیپ متحمل به تنش خشکی گیاه برنج

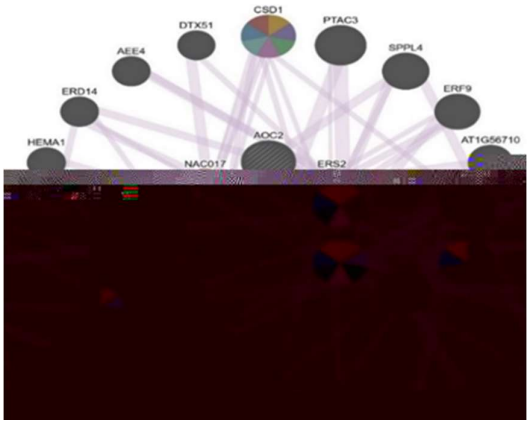
Table 4. Key genes identified using Cytoscape software in drought-tolerant genotypes of rice plants

ژن هاب	اسم کامل ژن	عملکرد
ATS1	*Peroxygenase*	cellular response to chemical stress
ANNAT	*Annexin*	cellular response to oxidative stress
AOC2	*Allene Oxide Cyclase*	cellular response to reactive oxygen species
MAPK7	*Mitogen-Activated Protein Kinase*	response to reactive oxygen species
DREB2A	*DRE-Binding Protein 2A*	cellular response to osmotic stress
ERS2	*Ethylene Response Sensor*	response to oxidative stress
CSD2	*Cytosolic Copper/Zinc Superoxide Dismutase*	superoxide metabolic process
NAC017	*Stress-Responsive NAC*	reactive oxygen species metabolic process

[12] node

[13] edge

(یعنی الگوهای بیان مشابه در شرایط مختلف) است. ژن‌های مرکزی، *CSD2*، *ATS1* و *DREB2A* نقش کلیدی دارند زیرا، با تعداد زیادی از ژن‌های دیگر از جمله *ERF9* ، *COR47* و *AT1G67850* ارتباط دارند. این ژن‌ها در پاسخ به تنش‌هایی مثل خشکی، شوری، یا سرما با توجه به حضور ژن‌هایی مثل *DREB2A* که در پاسخ به تنش‌های خشکی نقش دارند، تنظیم‌کننده‌های اصلی در شبکه می‌باشند. ژن‌های *CSD1*، *CSD2* و *NAC017* با رنگ‌بندی مشابه متعلق به یک خانواده ژنی و ژن‌های مرتبط با سم‌زدایی اکسیداتیو مثل سوپراکسید دیسموتاز یا یک مسیر زیستی خاص هستند؛ همچنین شبکه نشان می‌دهد که ژن‌های *ERF9* (عامل رونویسی مرتبط با اتیلن) و *COR47* (مرتبط با تحمل سرما) با چندین ژن دیگر هم‌بیان هستند، که نشان‌دهنده هماهنگی در پاسخ به تنش‌های محیطی می‌باشد. با توجه به اینکه داده‌های غربال‌گری ژنوتیپ‌های برنج تحت تنش (۰، ۱۰، ۱۵، ۲۰ درصد) مورد بررسی قرار گرفت، این شبکه هم‌بیان از تحلیل داده‌های بیان ژن در ژنوتیپ‌های برنج در شرایط تنش به‌دست آمداند؛ ژن‌هایی مانند *DREB2A* (مرتبط با پاسخ به خشکی) و *CSD1/CSD2* (مرتبط با استرس اکسیداتیو) می‌توانند با صفاتی که مورد بررسی قرار گرفت به‌ویژه در تحمل یا حساسیت به تنش مرتبط باشند. ژن‌های کلیدی *DREB2A* و *CSD2* که در مرکز شبکه قرار دارند با ژن‌های متعددی هم‌بیان هستند و احتمالا در ژنوتیپ متحمل (سپیدرود) نقش مهمی داشته باشند. بررسی بیان این ژن‌ها در ژنوتیپ‌های مختلف می‌تواند تأیید کند که آیا این ژن‌ها با صفات مثل شاخص بنیه بذر یا درصد جوانه‌زنی مرتبط هستند. ژن‌های مرتبط با حساسیت ژن‌هایی که ارتباطات کمتری دارند (ژن‌هایی که در لبه‌های شبکه قرار گرفتند) ممکن است در ژنوتیپ حساس (علی کاظمی) بیان کمتری داشته‌باشند. پیشنهاد می‌شود در تحقیقات بعدی بیان این ژن‌ها را در ژنوتیپ‌های سپیدرود (متحمل) و علی کاظمی (حساس) مقایسه شود تا مشخص شود آیا تفاوت بیان این ژن‌ها با تحمل یا حساسیت مرتبط است.



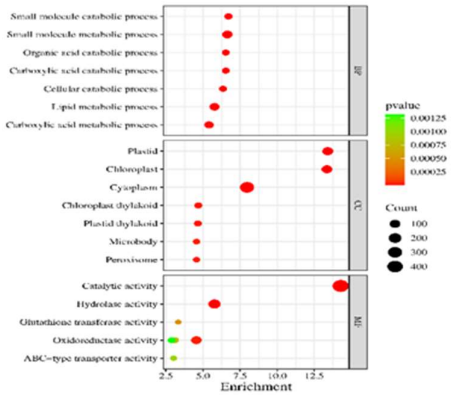
شکل۳- نمودار هم‌بیانی ژن‌های کلیدی شناسایی شده در ژنوتیپ متحمل گیاه برنج (ژن‌های کلیدی در وسط قرار دارند)

Figure 3. Co-expression diagram of key genes identified in the tolerant genotype of rice plant (key genes are in the middle)

تحلیل غنی‌سازی: بر اساس نتایج به دست آمده کربوکسیلیک،کاتابولیک‌اسیدارگانیک،کاتابولیکاسید،کاتاب ولیک مولکول‌های کوچک،کاتابولیک سلولی و متابولیک لیپید در دسته فرآیندهای بیولوژیکی قرار دارند. در دسته اجزای سلولی پلاستید، کلروپلاست، سیتوپلاسم، تیلاکوئید، پروکسی‌زوم، تیلاکوئیدکلروپلاست و میکروبادی در دسته اجزای سلولی قرار گرفتند. تنش بر اجزای سلولی مانند پلاستیدها (به‌ویژه کلروپلاست‌ها و تیلاکوئیدها) و پراکسی‌زوم‌ها تأثیر گذاشته است و درآخر دسته عملکرد مولکولی، فعالیت کاتالیتیک، فعالیت هیدرولاز، فعالیت ترانسفراز گلوتاتیون، فعالیت اکسیدوردوکتاز و فعالیت انتقال‌دهنده‌های نوع ABC می‌باشند. شکل ۴ نمودار حبابی غنی‌سازی[1] است که نتایج تحلیل غنی‌سازی[2] را برای

[1] enrichment bubble plot
[2] Enrichment Analysis

برای ژن‌های مختلف در سه دسته زیستی (BP[1]، CC[2] و MF[3]) نشان می‌دهد. این نوع نمودار در تحلیل‌های بیوانفورماتیکی، مانند تحلیل غنی‌سازی مسیر[4] یا تحلیل GO[5]برای شناسایی فرآیندهای زیستی، اجزای سلولی، یا فعالیت‌های مولکولی که در یک مجموعه ژن به‌طور معنی‌داری غنی شده‌اند، استفاده می‌شود.



شکل۴- نمودار حبابی غنی‌سازی تعدادی از ژن‌های تفرق بیان یافته در ژنوتیپ متحمل گیاه برنج در ۳ دسته عملکرد مولکولی، فرآیند بیولوژیکی و اجزای سلولی

Figure 4. Bubble chart of enrichment analysis of selected differentially expressed genes in the tolerant rice genotype in 3 groups Molecular Function, Biological Process and Cellular Component

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که میان ژنوتیپ‌های مختلف برنج از نظر تحمل به تنش خشکی در مرحله جوانه‌زنی تفاوت معنی‌داری وجود دارد. در میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی، ژنوتیپ «سپیدرود» به‌عنوان متحمل‌ترین و «علی کاظمی» به‌عنوان حساس‌ترین ژنوتیپ نسبت به تنش خشکی شناسایی شدند. تنش اسمزی ناشی از PEG سبب کاهش معنی‌دار در اغلب صفات رشدی از جمله طول ریشه‌چه، ساقه‌چه، درصد جوانه‌زنی و شاخص بنیه گیاهچه شد. همچنین، تحلیل‌های بیوانفورماتیکی مبتنی بر داده‌های ترانسکریپتومی، به شناسایی ژن‌های کلیدی مانند DREB2A، CSD2، ANNAT و AOC2 منجر گردید که در فرآیندهای بیولوژیکی مرتبط با تنظیم اسمزی، پاسخ به تنش اکسیداتیو و تحمل به خشکی نقش دارند. بر اساس یافته‌های این پژوهش با تغییر بیان ژن‌های کلیدی شناسایی شده و مسیرهای معرفی شده می‌توان ارقام بومی متحمل‌تری نسبت به تنش خشکی تولید کرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از موسسه تحقیقات برنج کشور در رشت و دانشگاه گیلان به جهت همکاری در اجرای این پژوهش قدردانی می‌شود..

منابع

Afiukwa, C. A. A., Faluyi, J. O., Atkinson, C. J., Ubi, B. E. U., Igwe, D. O., and Akinwale, R. O. 2016. Screening of some rice varieties and landraces cultivated in Nigeria for drought tolerance based on phenotypic traits and their association with SSR polymorphisms. African Journal of Agricultural Research, 11(29), 2599-2615. DOI: 10.5897/AJAR2016.11064. **(Journal)**

Ahmadi, J., Pour-Aboughadareh, A., Ourang, S. F., Mehrabi, A. A., and Siddique, K. H. 2018. Wild relatives of wheat: Aegilops–Triticum accessions disclose differential antioxidative and physiological responses to water stress. Acta Physiologiae Plantarum, 40, 1-14. DOI: 10.1007/s11738-018-2673-0. **(Journal)**

[1] Biological Process
[2] Cellular Component
[3] Molecular Function
[4] Pathway Enrichment
[5] Gene Ontology

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

Amin Deldar, Z., Sadeghi, F., Ebrahimi, M., Najari, Y., and Parmoon, Q. 2015. Investigation of germination and seedling growth of different rice cultivars under different salinity levels. Journal of Seed Research,5(4), 81-88.DOI:20.1001.1.22520961.1394.5.17.8.1 **(Journal)**

An, Y., Liang, Z., and Zhang, Y. 2011. Seed germination responses of Periploca sepium Bunge, a dominant shrub in the Loess hilly regions of China. Journal of arid environments, 75(5), 504-5. DOI: 10.1016/j.jaridenv.2010.12.006. **(Journal)**

Balouchi, H. 2010. Screening wheat parents of mapping population for heat and drought tolerance, detection of wheat genetic variation. Int. J. Biol. Life Sci, 6(1). DOI: 358-007-964-800 **(Journal)**

Bewley, J. D., and Black, M. 2012. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination: volume 2: viability, dormancy, and environmental control. Springer Science and Business Media. **(Book)**

Boydak, M., DİRİK, H., Tilki, F., and ÇALIKOĞLU, M. 2003. Effects of water stress on germination in six provenances of Pinus brutia seeds from different bioclimatic zones in Turkey. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 27(2), 91-97. o. 2, Article 5. Available at: https://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/vol27/iss2/5 **(Journal)**

Chen, J., Zhong, Y., and Qi, X. 2021. LncRNA TCONS_00021861 is functionally associated with drought tolerance in rice (Oryza sativa L.) via competing endogenous RNA regulation. BMC plant biology, 21, 1-12. DOI: 10.1186/s12870-021-03195-z **(Journal)**

Farshadfar, E., Zamani, M., Motallebi, M., andamp; Imamjomeh, A. 2001. Selection for drought resistance in chickpea lines. Iranian Journal of Agricultural Sciences, 32(1), 65-77. (In Persian) **(Journal)**

Foschi, M. L., Juan, M., Pascual, B., and Pascual-Seva, N. 2023. Influence of seed-covering layers on caper seed germination. Plants, 12(3), 439. DOI.org/10.3390/plants12030439. **(Journal)**

Fu, D., Wu, W., Mustafa, G., Yang, Y., and Yang, P. 2025. Molecular mechanisms of rice seed germination. New Crops, 2, 100051. DOI: 10.1016/j.ncrops.2024.100051. **(Journal)**

Golabadi, M., Arzani, A., andamp; Maibody, S. M. 2006. Assessment of drought tolerance in segregating populations in durum wheat. Afr J Agric Res, 1(5), 162-171. DOI: 10.5897/AJAR.9000070. **(Journal)**

Hadizadeh, M., Mohammad, A. M., Niazi, A., Esmailizadeh, K. A., Mehdizadeh, G. Y., and Molaei, M. S. 2013. Use of bioinformatics tools to study exon 2 of GDF9 gene in Tali and Beetal goats. SID. https://sid.ir/paper/116546/en. **(Journal)**

Hadizadeh, M., Niazi, A., Mohammad, A. M., Esmailizadeh, A., and Mehdizadeh, G. Y. 2014. Bioinformatics analysis of the BMP15 exon 2 in Tali and Beetal goats. https://sid.ir/paper/116676/en. **(Journal)**

Hanano, A., Blée, E., and Murphy, D. J. 2023. Caleosin/peroxygenases: multifunctional proteins in plants. Annals of botany, 131. DOI: org/10.1093/aob/mcad001. **(Journal)**

Ijaz, R., Ejaz, J., Gao, S., Liu, T., Imtiaz, M., Ye, Z., and Wang, T. 2017. Overexpression of annexin gene AnnSp2, enhances drought and salt tolerance through modulation of ABA synthesis and scavenging ROS in tomato. Scientific Reports, 7. DOI: .org/10.1038/s41598-017-11168-2. (Journal)

Jajarmi, V. 2009. Effect of water stress on germination indices in seven wheat cultivars. World Acad. Sci. Eng. Technol, 49, 105-106. (In Persian)**(Journal)**

Kholghi, M., Radmanesh, P., Darvishzadeh, R., Karizmadeh, G., Alipour, H., Soufimaleky, S., Maleki, H. H., and Kahrizi, D. The Role of Bioinformatics in Plant Breeding for Abiotic Stresses. Biochemistry, 3(4), 609-654. DOI: 10.22126/cbb.2025.11610.1099. **(Journal)**

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

Luo, Y., Wang, K., Zhu, L., Zhang, N., and Si, H. 2024. StMAPKK5 positively regulates response to drought and salt stress in potato. International journal of molecular sciences, 25(7), 3662. DOI: org/10.3390/ijms25073662. **(Journal)**

Maleki, B., Zarei Nejad, B., Sohbat, Ch., Chaghamirza, K., Akbari Fattahi, S., and Fardin, M. 2024. Germination of Iranian and European barley cultivars under salinity stress and its relationship with seed storage proteins. Plant Biotechnology Quarterly, 13(2), 71–83.DOI: 10.30473/cb.2023.69761.1932. (In Persian)**(Journal)**

Michel, B. E., and Kaufmann, M. R. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. Plant physiology, 51(5), 914-916. DOI: org/10.1104/pp.51.5.914. **(Journal)**

Mohsenzadeh Golfazani, M., Aghaeepour, S., Samiezadeh Lahiji, H., and Abdollahi, S. 2020. Studying expression of some genes associated with drought stress in rice (Oryza sativa L.). Cereal Research, 9(4), 299-314. DOI: 10.22124/cr.2020.14616.1563. **(Journal)**

Pandey, M. K., Bentley, A., Desmae, H., Roorkiwal, M., and Varshney, R. K. 2024. Introduction: Frontier Technologies for Crop Improvement. In Frontier Technologies for Crop Improvement (pp. 1-7). Springer. DOI: org/10.1007/978-981-99-4673-0_1. **(Journal)**

Pour, Kh., Ghorbani, V., and Gilani, F. 2020. A study of genetic diversity among rice genotypes based on germination and seedling growth traits under drought stress conditions. Plant Agricultural Science Biannual Journal, 10(2), 61–76. https://civilica.com/doc/1601504/ (In Persian)**(Journal)**

Qiao, B., Zhang, Q., Liu, D., Wang, H., Yin, J., Wang, R., He, M., Cui, M., Shang, Z., Wang, D., and Zhu, Z. 2015. A calcium-binding protein, rice annexin OsANN1, enhances heat stress tolerance by modulating the production of H2O2. Journal of experimental botany, 66(19), 5853-5866. DOI: org/10.1093/jxb/erv294 **(Journal)**

Stenzel, I., Otto, M., Delker, C., Kirmse, N., Schmidt, D., Miersch, O., Hause, B., and Wasternack, C. 2012. ALLENE OXIDE CYCLASE (AOC) gene family members of Arabidopsis thaliana: tissue- and organ-specific promoter activities and in vivo heteromerization. Journal of experimental botany, 63(17), 6125-6138. DOI: org/10.1093/jxb/ers261. **(Journal)**

Sun, T., Cen, G., You, C., Lou, W., Wang, Z., Su, W., Wang, W., Li, D., Que, Y., and Su, Y. 2020. ScAOC1, an allene oxide cyclase gene, confers defense response to biotic and abiotic stresses in sugarcane. Plant Cell Reports, 39, 1785-1801. DOI: org/10.1007/s00299-020-02606-z. **(Journal)**

Susilastuti, D. 2018. Agricultural production and its implications on economic growth and poverty reduction. DOI: 10.35808/ersj/955. **(Journal)**

Zamani, A., Amiri, H., Hamzeh, A., and Esmaeili, S. 2018. The effect of different levels of drought stress on germination components of two fenugreek populations from Isfahan and India. New Findings in Biological Sciences, 5(2), 183–191. https://civilica.com/doc/1834981/. (In Persian) **(Journal)**

Zheng, C., Wang, X., Xu, Y., Wang, S., Jiang, X., Liu, X., Cui, W., Wu, Y., Yan, C., and Liu, H. 2023. The peroxidase gene OsPrx114 activated by OsWRKY50 enhances drought tolerance through ROS scavenging in rice. Plant Physiology and Biochemistry, 204, 108138. DOI: 10.1016/j.plaphy.2023.108138. **(Journal)**

Screening of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes under drought stress at the germination stage and identification of key genes involved in the response to stress

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

Received: June 6, 2025 Accepted: July 14, 2025

Abstract

Environmental stresses such as drought, salinity, and heat pose significant threats to agriculture. Drought stress is one of the most critical abiotic stresses affecting rice, leading to reduced crop yield. In this study, 12 native rice (Oryza sativa L.) genotypes were evaluated for drought tolerance during the germination stage. Osmotic stress was induced using polyethylene glycol (PEG6000) at four levels (0%, 10%, 15%, and 20%). The experiment was conducted in a completely randomized design with a factorial arrangement and three replications, assessing morphological traits including rootlet length, shoot length, fresh and dry weight, germination percentage, seed vigor index, and allometric coefficient. The results indicated that the effects of genotype, stress level, and their interaction were significant for most traits. Using the results of factor analysis based on the components of the allometric coefficient and seed vigor index, the 'Sepidrud' genotype was identified as the most tolerant, while the 'Ali Kazemi' genotype was the most sensitive to drought stress at the germination stage. Bioinformatics analyses of available transcriptomic data from databases, including two drought-resistant and sensitive genotypes, were performed, identifying key genes such as DREB2A, CSD2, ANNAT, and AOC2. Gene enrichment analysis revealed that metabolic processes and pathways related to oxidative stress and osmotic regulation were activated in response to drought stress. The findings of this study could be valuable for selecting resistant genotypes and informing future breeding strategies.

Keywords: Gene Co-expression; Drought; Morphological Traits; Oryza sativa; Tolerance Indices

How to cite this article

Shojaee, S., Mohsenzadeh, M., Pasandideh, M. and Samizadeh, H. 2025. Screening of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes under drought stress at the germination stage and identification of key genes involved in the response to stress. Iranian Journal of Seed Science and Research, 12(1): 77-89. (In Persian)**(Journal)**

DOI: 10.22124/jms.2025.8931

COPYRIGHTS

Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the Iranian Journal of Seed Science and Research

The content of this article is distributed under Iranian Journal of Seed Science and Research open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY4.0) License. For more information, please visit http://jms.guilan.ac.ir/

1. Ph.D Candidate, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. sshojaee8@gmail.com
2. Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir
3. Ph.D Gratuated of Agricultural Biotechnology at University of Guilan and Researcher at Zist Radan Technology Unit of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran-North Branch, Rasht, Iran. Pasandide.m92@gmail.com
4. Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht. Iran. hsamizadeh@guilan.ac.ir

*Corresponding author: mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir