


Bioinformatic identification of genes and microRNAs responsive to ethanol spraying after drought stress in Arabidopsis

Maryam Aghajanlu¹, Maryam Pasandideh Arjmand², Mohammad Mohsenzadeh Golfazani^{1*} , Habibollah Samizadeh Lahiji⁴

1. Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran-BioGenTAC Inc., Technology Incubator of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran-North Branch (ABRII), Rasht, Iran.

Correspondence:

Mohammad Mohsenzadeh Golfazani

Email:

Mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir

Received: 19/Oct/2025

Accepted: 25/May/2026

How to cite:

Aghajanlu, M., Pasandideh Arjmand, M., Mohsenzadeh Golfazani, M., & Habibollah Samizadeh Lahiji, H. (2025). Bioinformatic identification of genes and microRNAs responsive to ethanol spraying after drought stress in Arabidopsis. *Crop Biotechnology*, 15 (2), 71-89

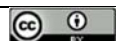
(DOI: [10.30473/cb.2026.76193.2022](https://doi.org/10.30473/cb.2026.76193.2022))

ABSTRACT

Drought stress is one of the main factors limiting plant growth and yield under unstable climatic conditions. In this study, transcriptomic data of ethanol-treated and control plants under drought stress conditions and at time intervals of 1, 3, and 5 days after stress were extracted from the GEO database and analyzed using the GEO2R tool. Genes with significant expression changes were identified based on an adjusted p-value < 0.05 and |LogFC| ≥ 1. The protein interaction network was constructed with Cytoscape software and key genes were determined with the CytoHubba plugin. Related functional pathways were also analyzed using DAVID and ShinyGO tools. Also, the regulatory microRNAs of hub genes were identified using the psRNATarget tool. A total of 1144 differentially expressed genes (DEGs) were identified, including 567 up-regulated and 578 down-regulated genes. Ten key genes including *KRP1*, *ACS6*, *ZAT10*, *PUMP4*, *CAF1-11*, *CAF1-9*, *F23F1.6*, *NUDT21*, *BAP1* and *F27B13.20* were identified as central regulators involved in drought response, hormone signaling, oxidative stress defense and gene expression regulation that are themselves regulated by important miRNAs such as ath-miR5021, ath-miR854, ath-miR156, etc. The enriched functional pathways included plant hormone signal transduction, carotenoid biosynthesis and circadian rhythm. These findings suggest that the exogenous application of ethanol as a cheap and biocompatible compound can improve plant drought resistance through changes in key gene expression and activation of effective defense pathways.

KEY WORDS

Ethanol, Gene Network Analysis, Key Genes, Hypoxia Response.



«مقاله پژوهشی»

شناسایی بیوانفورماتیکی ژن‌ها و microRNAهای پاسخ‌دهنده به اتانول پاشی پس از تنش خشکی در آراییدوپسیس

مریم آقاجانلو^۱، مریم پسندیده ارجمند^۲، محمد محسن‌زاده گلفزانی^{۱*}، حبیب‌اله سمیع‌زاده لاهیجی^۱

چکیده

تنش خشکی یکی از عوامل اصلی محدودکننده رشد و بهره‌وری گیاه در شرایط آب‌وهوایی ناپایدار است. در این مطالعه داده‌های ترانسکریپتومی حاصل از گیاهان تیمار شده با اتانول و شاهد، در شرایط تنش خشکی و در فواصل زمانی ۱، ۳ و ۵ روز پس از تنش از پایگاه GEO استخراج و با استفاده از ابزار GEO2R آنالیز شدند. ژن‌های دارای تغییر بیان معنادار براساس مقدار *adjusted p-value* کمتر از ۰/۰۵ و $|\text{LogFC}|$ بزرگ‌تر مساوی ۱ شناسایی شدند. شبکه برهم‌کنش پروتئینی با نرم‌افزار Cytoscape رسم و ژن‌های کلیدی با افزونه CytoHubba تعیین شد. مسیرهای عملکردی نیز با استفاده از ابزار DAVID و ShinyGO مورد تحلیل قرار گرفتند. همچنین microRNAهای تنظیم‌کننده ژن‌های کلیدی با استفاده از ابزار psRNA Target شناسایی شدند. در مجموع ۱۱۴۴ ژن با بیان متفاوت (DEG) شامل ۵۶۷ ژن افزایش بیان یافته و ۵۷۸ ژن کاهش بیان یافته شناسایی شد. ده ژن کلیدی شامل *NUDT21*، *F23F1.6*، *CAF1-9*، *CAF1-11*، *PUMP4*، *ZAT10*، *ACS6*، *KRP1*، *F27B13.20* و *BAP1* به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های مرکزی دخیل در پاسخ به خشکی، سیگنالینگ هورمونی، دفاع در برابر استرس اکسیداتیو و تنظیم بیان ژن شناسایی شدند که خود توسط miRNAهای مهمی همچون *ath-miR5021*، *ath-miR854* و *ath-miR156* و غیره تنظیم می‌شوند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که استفاده برون‌زا از اتانول به‌عنوان یک ترکیب ارزان‌قیمت و زیست‌سازگار، می‌تواند مقاومت گیاه به خشکی را از طریق تغییر در بیان ژن‌های کلیدی و فعال‌سازی مسیرهای دفاعی بهبود بخشد.

واژه‌های کلیدی

اتانول، پاسخ به هیپوکسی، تحلیل شبکه‌های ژنی، ژن‌های کلیدی.

۱. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۲. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران - پژوهشگر، واحد فنوار زیست رادان ژن کاسپین (بیوژن تک)، مرکز رشد واحدهای فنوار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور، رشت، ایران.

نویسنده مسئول:

محمد محسن‌زاده گلفزانی

رایانامه: Mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۰۴

استناد به این مقاله:

آقاجانلو، مریم؛ پسندیده ارجمند، مریم؛ محسن‌زاده گلفزانی، محمد و سمیع‌زاده لاهیجی، حبیب‌اله (۱۴۰۴). شناسایی بیوانفورماتیکی ژن‌ها و microRNAهای پاسخ‌دهنده به اتانول پاشی پس از تنش خشکی در آراییدوپسیس، فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۵ (۲)، ۷۱-۸۹.
(DOI: [10.30473/cb.2026.76193.2022](https://doi.org/10.30473/cb.2026.76193.2022))



مقدمه

تنش‌های محیطی شامل تنش‌های زیستی و غیرزیستی، همواره از چالش‌های اصلی در مسیر بقای گیاهان محسوب می‌شوند. گیاهان برای زنده ماندن باید با این تنش‌ها سازگار شوند و در طی تکامل، مکانیسم‌های پیچیده‌ای برای مقابله با آن‌ها توسعه داده‌اند (Cai et al., 2024). امنیت غذایی یکی از نگرانی‌های جدی برای توسعه پایدار است. هم‌اکنون در جهان تولید و توزیع مواد غذایی به دلیل افزایش جمعیت و تقاضا و تغییرات آب‌وهوایی تحت فشار قرار دارد (Chandrashekar et al., 2023). تنش خشکی جزو مخرب‌ترین تنش‌های محیطی است که رشد گیاه و قابلیت‌های فتوسنتزی را محدود می‌کند و باعث کاهش عملکرد می‌شود. درک کامل پاسخ به تنش خشکی گیاه برای توسعه راهبردهای مؤثر برای کاهش اثرات نامطلوب تنش خشکی ضروری است (Bashir et al., 2022). خشکی مانع فتوسنتز و حرکت روزنه‌ها شده و عامل بازدارنده در رشد گیاهان است (Yang et al., 2021). تنش خشکی می‌تواند تجمع گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و پراکسیداسیون لیپیدی غشایی را تحریک کند که در نهایت منجر به رشد ضعیف و حتی مرگ گیاهان در موارد شدید می‌شود (Rahman et al., 2022; Pasandideh Arjmand et al., 2017). یافتن مسیرها و تنظیم آن‌ها به منظور سازگاری گیاهان با شرایط سخت محیطی یک امر ضروری است. گیاهان در پاسخ به تنش خشکی به طور کلی سه روش تطبیقی را در پیش گرفته‌اند که شامل تحمل به خشکی، فرار و اجتناب است (Cai et al., 2024).

MicroRNAها (miRNAs) RNAهای کوچک غیرکدکننده‌ای هستند که در تنظیم mRNA هدف از طریق مکانیسم‌های برش (Cleavage) یا مهار ترجمه (Translational) نقش دارند. این RNAهای کوچک می‌توانند بر رشد، نمو، تحمل تنش اسمزی، دفاع آنتی‌اکسیدانی و سیگنال‌دهی با واسطه فیتوهورمون‌ها در طول تنش خشکی تأثیر بگذارند و نقش بسیار مهمی در مکانیسم تنظیمی ژن‌های کلیدی پاسخ‌دهنده به تنش برعهده دارند (Singh et al., 2023). شناسایی

فرایندهای زیستی و ژن‌ها و miRNAهای کلیدی مرتبط با تنش خشکی در سطوح مختلف در گیاه مدل آرابیدوپسیس می‌تواند نقشی کلیدی در کشف مکانیسم‌های تنظیمی مؤثر بر تحمل گیاه به تنش‌های محیطی ایفا کند (Mohsenzadeh Golfazani et al., 2023; Pasandideh et al., 2022). گیاهان می‌توانند بسیاری از ترکیبات سازگار مانند پرولین، اسیدهای آمینه و قندها را برای حفظ تنظیم اسمزی در شرایط تنش خشکی سنتز کنند. علاوه بر این گیاهان مکانیسم‌های پیچیده محافظت از تنش اکسیداتیو را برای جلوگیری از آسیب اکسیداتیو ناشی از ROS با افزایش سنتز آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی و تحریک فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی ایجاد کرده‌اند (Mohsenzadeh Golfazani et al., 2019; Rahman et al., 2022). تحریک‌کننده‌ها به‌عنوان ترکیبات پیام‌رسان کلیدی، نقش مهمی در تعدیل پاسخ‌های گیاهان به تنش‌های غیرزیستی ایفا می‌کنند. این ترکیبات منجر به تغییرات فیزیولوژیکی شده و بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش را از طریق سنتز مولکول‌های علامت‌دهی تحریک می‌کنند (Forouzandeh et al., 2024). اتانول به‌عنوان یکی از مولکول‌های علامت‌دهی مهم، نقش مؤثری در کاهش اثرات نامطلوب چندین تنش غیرزیستی مانند تنش سرما در برنج و تنش شوری در سویا، برنج و آرابیدوپسیس نشان داده است (Rahman et al., 2022). اتانول می‌تواند اثرات مضر شوری و تنش گرمایی را کاهش دهد (Bashir et al., 2022). استفاده برون‌زا از اتانول باعث افزایش تحمل به تنش شوری بالا و نور شدید در آرابیدوپسیس و برنج شده است که این کار از طریق خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن انجام می‌شود و باعث افزایش تحمل به تنش‌های خشکی و گرما در گیاهان می‌شود (Vu et al., 2022). گزارش‌ها حاکی از آن است که مصرف متانول و اتانول باعث بهبود عملکرد، تسریع در فرایند رسیدگی، کاهش اثرات منفی تنش خشکی و کاهش نیاز آبی گیاهان می‌شود (Mousavi et al., 2021). کاربرد خارجی اتانول موجب افزایش تحمل به

مقرون به صرفه و پایدار برای بهبود عملکرد گیاهان هستند. بنابراین، در این مطالعه با استفاده از داده‌های ترانسکریپتومی و رویکردهای بیوانفورماتیکی، اثر تیمار اتانول بر افزایش تحمل گیاه مدل *آرابیدوپسیس تالیانا* به تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفت. در این راستا، شناسایی ژن‌های دارای تغییر بیان معنادار در پاسخ به تیمار اتانول، تحلیل شبکه‌های برهم‌کنش پروتئینی برای تعیین ژن‌های کلیدی و شناسایی miRNAهای تنظیمی این ژن‌ها جهت شناسایی مکانیسم‌های مولکولی افزایش مقاومت به تنش خشکی، به‌عنوان محورهای اصلی پژوهش در نظر گرفته شدند.

روش‌شناسی پژوهش

در این پژوهش، داده‌های میکروآرایه گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* از پایگاه داده عمومی GEO در NCBI که شامل نمونه‌های تیمار شده با اتانول و نمونه‌های شاهد تحت شرایط تنش خشکی بود، در سه بازه زمانی ۱، ۳ و ۵ روز پس از اعمال تنش با شماره دسترسی GSE201609 که توسط Bashir و همکاران (۲۰۲۲) منتشر شده است، استخراج گردید (Bashir et al., 2022). هر تیمار شامل سه تکرار زیستی مستقل بود تا از دقت آماری نتایج اطمینان حاصل شود. پس از دریافت داده‌ها، آنالیز اولیه با استفاده از ابزار

GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r>)

انجام شد. داده‌ها ابتدا براساس روش \log_2 transformation نرمال‌سازی شدند تا پراکندگی داده‌ها کاهش یافته و میانگین بیان بین نمونه‌ها یکنواخت گردد. پس از آنالیز بیان ژن‌ها بین گروه شاهد و تیمار شده، ژن‌های با مقدار $\text{adjusted } p\text{-value} < 0.05$ و $|\text{LogFC}| \geq 1$ به‌عنوان ژن‌های دارای تغییر بیان معنادار (DEGs) در نظر گرفته شدند. داده‌های به‌دست‌آمده در قالب فایل خروجی از GEO2R استخراج و برای تحلیل‌های بعدی آماده‌سازی شدند. برای بررسی روابط عملکردی بین پروتئین‌های حاصل از ژن‌های شناسایی شده، از نرم‌افزار Cytoscape v3.10.2 استفاده شد. شبکه تعاملات پروتئینی (PPI network) با داده‌های پایگاه STRING database (<https://string->)

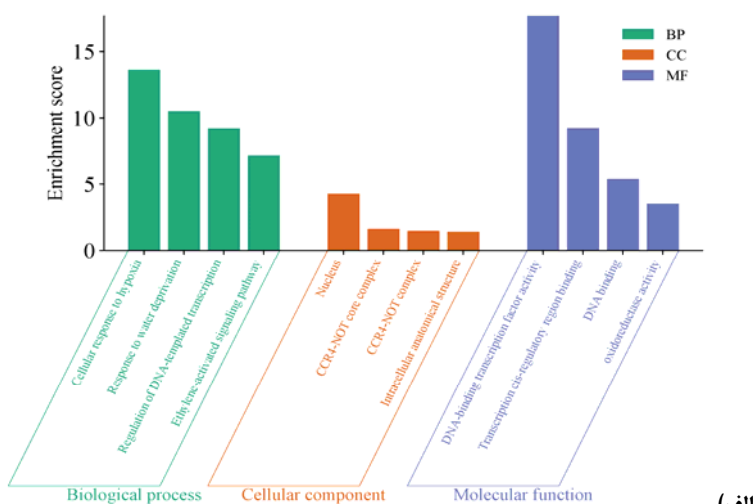
شوری زیاد، خشکی و تنش گرمایی در گونه‌های مختلف گیاهی می‌شود. تحلیل ترانسکریپتومی نشان داده است که تیمار پیش‌تنشی با اتانول موجب افزایش بیان ژن‌های مرتبط با مسیر سیگنال‌دهی ABA مانند *PP2Cs* و *AITRs* و ژن‌های مرتبط با پاسخ به تنش و تاخوردگی پروتئین مانند پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) شد. علاوه بر این، در گیاهان تیمار شده با اتانول، افزایش بیان ژن‌های القا شده توسط خشکی در حین تنش، با تأخیر نسبت به گیاهان شاهد که فقط با آب تیمار شده بودند، رخ داد. تیمار با اتانول با فعال‌سازی مسیر علامت‌دهی ABA باعث بسته‌شدن روزنه‌ها و از طریق فعال‌سازی شبکه پروتئین‌های شوک حرارتی، واکنش‌های مربوط به تاخوردگی پروتئین و تغییر در متابولیسم قند و نشاسته، منجر به افزایش اجتناب از خشکی در گیاهان می‌شود (Vu et al., 2022). کاربرد خارجی اتانول با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله پراکسیداز، کاتالاز، گلوتاتیون-S-ترانسفراز و آسکوربات پراکسیداز و همچنین افزایش محتوای فلاونوئیدهای کل در برگ‌های سویا تحت تنش خشکی، اثر اکسیداتیو ناشی از ROS را کاهش داد (Rahman et al., 2022). در مطالعه‌ای دیگر اتانول در گیاه سویا علاوه بر اثر افزایش رشد در شرایط عادی، تحمل گیاه سویا به خشکی را نیز بهبود بخشید. این بهبود از طریق افزایش بیوماس ریشه، ظرفیت فتوسنتزی، کارایی مصرف آب، محافظت از رنگدانه‌های فتوسنتزی، کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از ROS و تقویت مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی صورت گرفت. هم‌چنین اتانول باعث افزایش سطح ترکیبات اسمزی مانند آمینواسیدهای آزاد و قندهای محلول شد که به حفظ وضعیت آب برگ‌ها کمک کرد (Rahman et al., 2022). تحمل به خشکی ناشی از اتانول ممکن است برای کاهش اثرات نامطلوب تنش خشکی مورد استفاده قرار بگیرد و جایگزینی برای توسعه گیاهان متحمل به خشکی از طریق روش‌های پر زحمت اصلاحی کلاسیک باشد (Bashir et al., 2022). با توجه به کاهش روزافزون منابع آب و افزایش شدت تنش خشکی، بسیاری از کشاورزان به‌دنبال روشی

میله‌ای حاصل از غنی‌سازی GO و KEGG با استفاده از ابزار SRPlot (Bioinformatics.com.cn) رسم گردید تا مسیرهای عملکردی فعال شده در تیمار اتانول نسبت به شاهد به صورت بصری مقایسه شود. جهت افزایش صحت تحلیل‌ها، نتایج حاصل از ابزارهای مختلف با یکدیگر مقایسه و ژن‌های مشترک در چند مسیر به‌عنوان کاندیدهای نهایی ژن‌های تنظیم‌کننده پاسخ به خشکی انتخاب شدند. در نهایت، نتایج حاصل از این تحلیل‌ها مبنای تفسیر شبکه‌های مولکولی و مسیرهای زیستی مرتبط با تحمل به خشکی در گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* تحت تیمار اتانول قرار گرفت تا نقش احتمالی این ترکیب در تنظیم بیان ژن‌ها و بهبود مقاومت گیاه در برابر کم‌آبی مشخص شود.

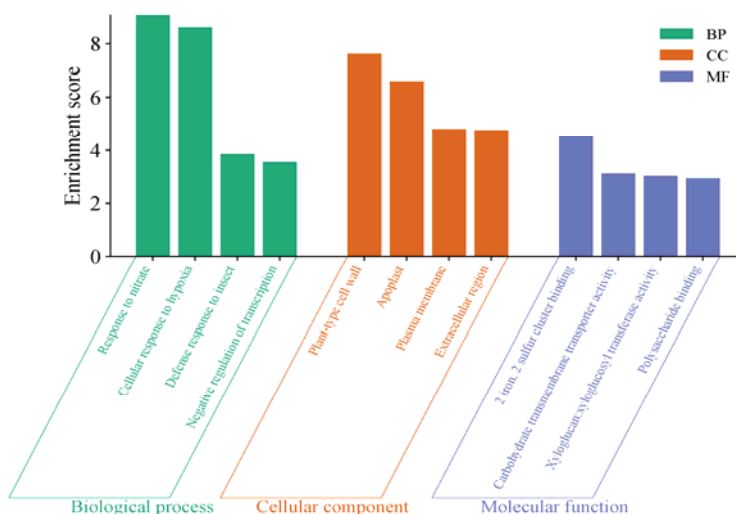
نتایج و بحث

نتایج نشان داد که تیمار با اتانول پس از ایجاد تنش خشکی، سبب تغییر بیان معنادار ۱۱۴۴ ژن شد که از این تعداد، ۵۶۷ ژن افزایش بیان و ۵۷۸ ژن کاهش بیان داشتند. در بین ژن‌هایی که افزایش بیان داشتند، فرایندهای زیستی هم‌چون پاسخ سلولی به هیپوکسی (کمبود اکسیژن)، پاسخ به کمبود آب، تنظیم رونویسی با الگوی DNA، مسیر فعال شده با اتیلن، پاسخ به آسبیزیک‌اسید، پاسخ به زخمی شدن و پاسخ به سرما و اجزای سلولی همچون هسته و عملکردهای مولکولی هم‌چون فعالیت فاکتور رونویسی اتصال‌دهنده به DNA، اتصال به ناحیه تنظیمی سیس در رونویسی، فعالیت اکسیدوردوکتاز عمل‌کننده بر روی دهنده‌های جفت‌شده با ورود یا کاهش اکسیژن مولکولی و فعالیت مونواکسیژناز معنادار بود (شکل ۱-الف). در بین ژن‌های با کاهش بیان، فرایندهای زیستی پاسخ به نیترات، پاسخ سلولی به هیپوکسی، تنظیم منفی رونویسی توسط RNA پلیمراز II و پاسخ به کمبود نور و اجزای سلولی همچون دیواره سلولی از نوع گیاهی، آپوپلاست، غشای پلاسمایی و وزیکول ترشحی و عملکردهای مولکولی شامل اتصال به ترکیبات آهن-گوگرد، فعالیت ناقل غشایی کربوهیدرات، فعالیت زایلوگلوکوزیل ترانسفراز و اتصال به پلی‌ساکارید مشاهده شد (شکل ۱-ب).

(db.org/) ایجاد گردید و معیار ≥ 0.4 combined score برای اطمینان از ارتباط عملکردی ژن‌ها در نظر گرفته شد. در مرحله بعد، با استفاده از افزونه CytoHubba و روش MCC (Maximal Clique Centrality)، ژن‌های با بیشترین درجه‌ی تعامل به‌عنوان ژن‌های کلیدی انتخاب شدند. این ژن‌ها از لحاظ جایگاه شبکه‌ای و نقش بالقوه در تحمل به تنش خشکی مورد توجه قرار گرفتند. به‌منظور بررسی مکانیسم‌های تنظیمی ژن‌های کلیدی پاسخ‌دهنده به تیمار اتانول پس از تنش خشکی، ابتدا توالی mRNA ژن‌های کلیدی از پایگاه داده NCBI استخراج شد و سپس miRNAهای تنظیم‌کننده ژن‌های کلیدی توسط ابزار psRNA Target و براساس اطلاعات موجود در مورد miRNAهای شناسایی شده در گیاه مدل *آرابیدوپسیس شناسایی* شد. شبکه برهمکنش ژن‌های هدف و miRNAها توسط نرم‌افزار Cytoscape v3.10.2 و براساس عدد Expectation کوچکتر و مساوی ۵ رسم شد. هم‌چنین به‌منظور بررسی عملکرد ژن‌ها و مسیرهای مولکولی فعال شده توسط تیمار اتانول، تحلیل هستی‌شناسی ژن‌ها (GO analysis) و تحلیل مسیرهای عملکردی (KEGG pathway analysis) با بهره‌گیری از ابزار DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) انجام شد. تحلیل GO در سه سطح فرایندهای زیستی (BP)، اجزای سلولی (CC) و عملکردهای مولکولی (MF) انجام شد. مسیرهایی با مقدار p-value کوچکتر از ۰/۰۵ به‌عنوان مسیرهای معنادار در نظر گرفته شدند. برای افزایش دقت و اطمینان از صحت نتایج، از ابزار ShinyGO v0.82 (<https://bioinformatics.sdstate.edu/go>) برای بازتحلیل داده‌ها و بررسی هم‌پوشانی مسیرهای بیولوژیکی، اجزای سلولی و عملکردهای مولکولی استفاده شد. این ابزار براساس داده‌های پایگاه‌های KEGG و STRING شبکه‌های عملکردی را ترسیم کرده و امکان مشاهده ارتباطات بین ژن‌ها را فراهم می‌کند. ژن‌های با بیان افزایشی و کاهش‌ی به‌صورت جداگانه در این ابزار تحلیل و نتایج به شکل نمودارهای شبکه‌ای و غنی‌سازی GO نمایش داده شدند. در ادامه، نمودارهای



(الف)



(ب)

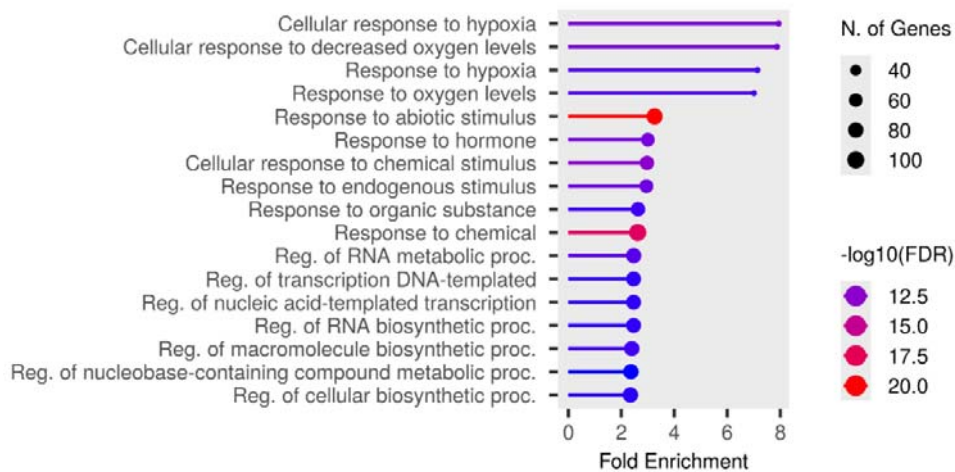
شکل ۱. فرایندهای زیستی، اجزای سلولی و عملکردهای مولکولی ژن‌های با افزایش (الف) و کاهش (ب) بیان در تیمار اتانول پس از تنش خشکی گیاه آرابیدوپسیس

Figure 1. Biological processes, cellular components, and molecular functions of up-regulated (A) and down-regulated (B) genes in Arabidopsis induced by ethanol treatment under drought stress.

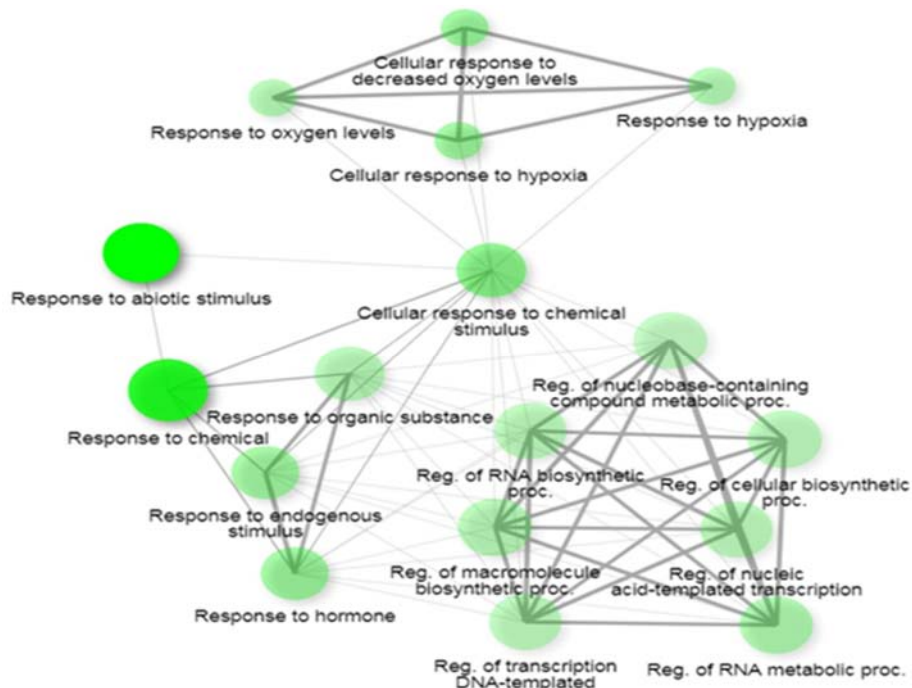
مولکولی و اجزای سلولی ژن‌های با افزایش بیان در ابزار ShinyGO قابل دسترس نبود.

هم‌چنین نتایج نشان داد ژن‌های با کاهش بیان در فرایندهای زیستی پاسخ به نیترات، پاسخ دفاعی به حشرات، پاسخ به کمبود نور، پاسخ سلولی به هیپوکسی، پاسخ به تنش و غیره نقش داشتند (شکل ۳).

بررسی فرایندهای زیستی ژن‌های با افزایش بیان در ابزار ShinyGO نشان داد که این ژن‌ها در فرایندهای زیستی مرتبط با تنش مانند پاسخ سلولی به هیپوکسی، پاسخ سلولی به کمبود سطح اکسیژن، پاسخ به محرک‌های غیرزیستی، پاسخ به هورمون، پاسخ به محرک‌های شیمیایی، پاسخ به محرک‌های خارجی و غیره نقش داشتند (شکل ۲). اطلاعاتی از عملکردهای



(الف)



(ب)

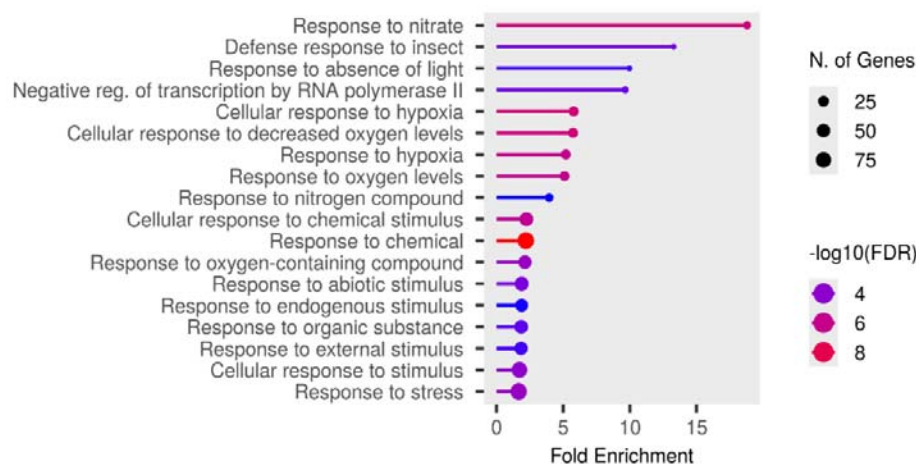
شکل ۲. نمودار میله‌ای (الف) و شبکه (ب) فرایندهای زیستی ژن‌های با بیان افزایشی حاصل از تیمار اتانول در شرایط تنش خشکی توسط ابزار ShinyGO. **Figure 2.** Bar chart (A) and network analysis (B) of biological processes associated with up-regulated genes induced by ethanol treatment under drought stress conditions using the ShinyGO tool

تیمار شیمیایی با اتانول به‌عنوان یک priming مؤثر، نشان داده که می‌تواند با فعال‌سازی مسیرهای چندگانه پاسخ به تنش خشکی نقش حفاظتی مهمی ایفا کند. این پروسه موجب کاهش تعرق گیاه از طریق بسته شدن روزنه‌ها می‌شود که در آرابیدوپسیس وابسته

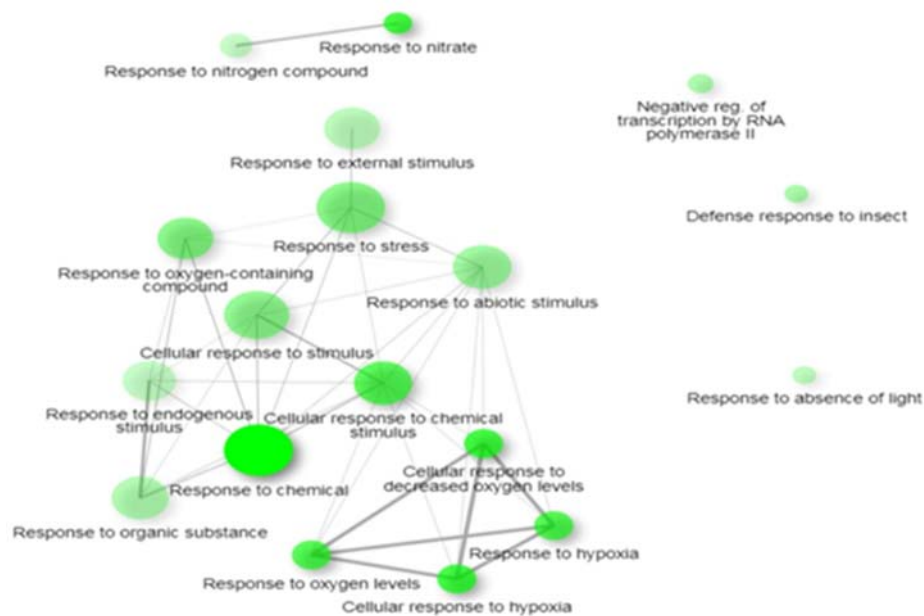
همچنین عملکردهای مولکولی این ژن‌ها شامل فعالیت اکسیدودوکتازی گلوکاتینون، فعالیت انتقال‌دهنده غشایی نوکلئوزید پورینی و غیره بود. اجزای سلولی شامل آپوپلاست، دیواره سلولی، و زیکول ترش‌حی، مناطق خارج سلولی و غیره بود (شکل‌های ۴ و ۵).

سلولی تحت خشکی دارند (Bashir *et al.*, 2022). علاوه بر این، تحلیل‌های NMR نشان داده‌اند که اتانول به سرعت به ترکیباتی مانند سیترات، سوکسینات، مالات و حتی پوترسین در ریشه تبدیل می‌شود. تجمع این آمین‌پلی‌آمین‌ها مانند پوترسین در پاسخ به تنش اهمیت ویژه‌ای دارد و می‌تواند نقش تکمیلی در افزایش تحمل گیاه داشته باشد (Bashir *et al.*, 2025).

به مسیر علامت‌دهی ABA بوده است. در گیاهانی با جهش در ژن *ABI1* این اثر مشاهده نشده است که نشان می‌دهد سیگنال ABA برای اثرات اتانول ضروری است. از نظر متابولیسم، اتانول بعد از تبدیل به استات به چرخه TCA وارد می‌شود و از طریق گلوکونیوزنز، تجمع قندهایی مانند گلوکز، فروکتوز و ساکارز و هم‌چنین آمینواسید پرولین را ارتقا می‌دهد. این ترکیبات به‌عنوان اسمولیت‌های حفاظتی نقش مهمی در حفظ ساختارهای

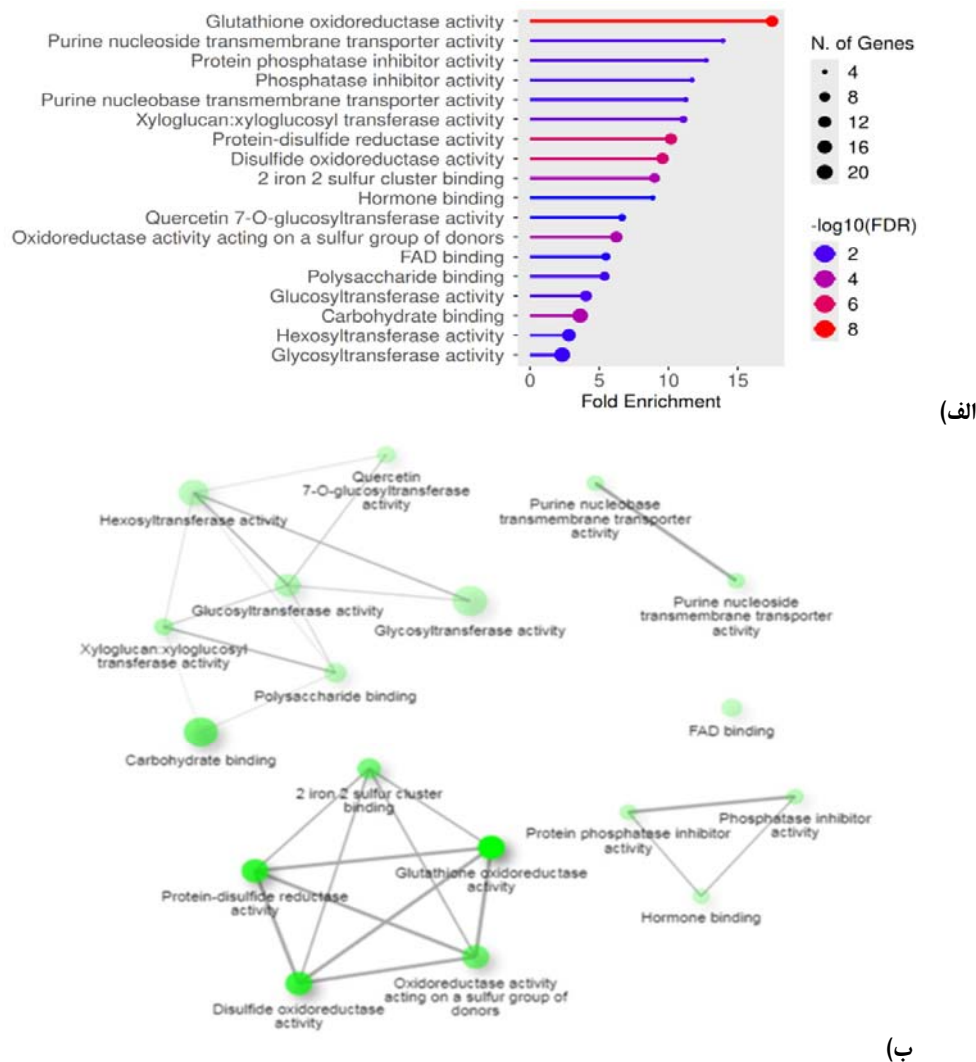


(الف)



(ب)

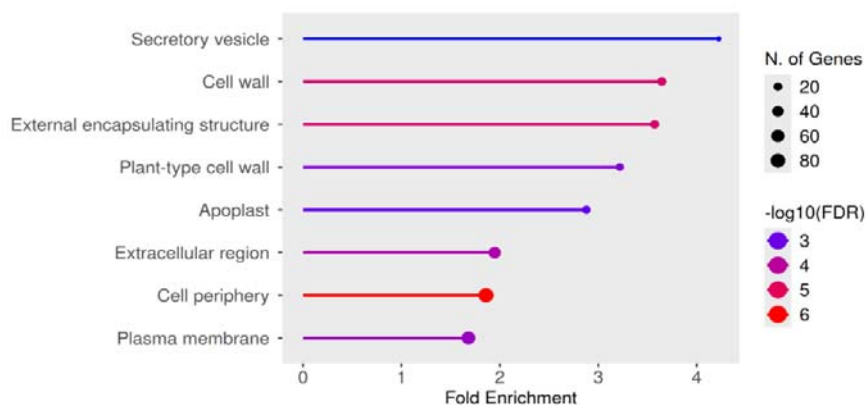
شکل ۳. نمودار میله‌ای (الف) و شبکه (ب) فرایندهای زیستی ژن‌های با بیان کاهشی حاصل از تیمار اتانول در شرایط تنش خشکی توسط ابزار ShinyGO. **Figure 3.** Bar chart (A) and network analysis (B) of biological processes associated with down-regulated genes induced by ethanol treatment under drought stress conditions using the ShinyGO tool



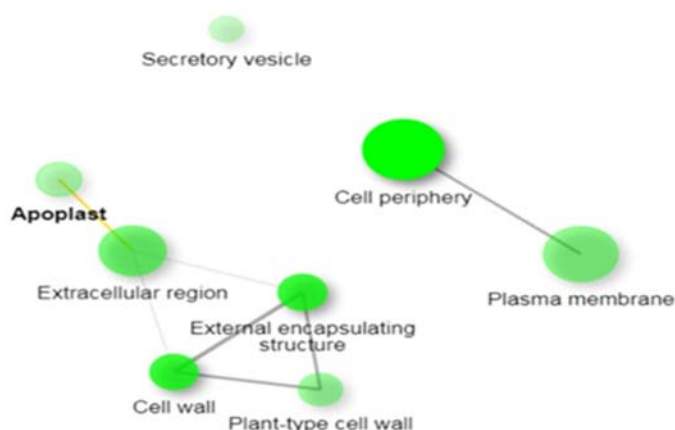
شکل ۴. نمودار میله‌ای (الف) و شبکه (ب) عملکردهای مولکولی ژن‌های بیان کاهشی حاصل از تیمار اتانول در شرایط تنش خشکی توسط ابزار ShinyGO. **Figure 4.** Bar chart (A) and network analysis (B) of molecular functions associated with down-regulated genes induced by ethanol treatment under drought stress conditions using the ShinyGO tool

است. در سویا، تیمار اتانول به‌طور مشهود باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های APX، CAT و POD شده است که در حذف هیدروژن پراکسید و کاهش آسیب اکسیداتیو نقش دارند (Rahman *et al.*, 2022). از طرفی تیمار با اتانول بیان ژن‌های مرتبط با اتوفازی و مسیرهای مقابله با ROS را به‌طور معنی‌دار افزایش می‌دهد که این مکانیسم برای پاکسازی پروتئین‌های آسیب‌دیده و حفظ سلامت سلولی در شرایط استرس ضروری است (Yuan *et al.*, 2020).

در مطالعات دیگر نیز تایید شده که اتانول موجب فعال‌سازی ATP-dependent UPR (Unfolded Protein Response) می‌شود و پاسخ‌های استرس گرمایی را تقویت می‌کند. همین مسیر می‌تواند در شرایط خشکی از طریق تنظیم پروتئین‌های مرتبط با تنش و بهبود حفاظت سلولی نقش مهمی ایفا کند (Todaka *et al.*, 2024). اتانول اثر بخشی در تنش‌های محیطی دیگر (خشکی، گرما، شوری ...) را به‌واسطه فعال‌سازی پاسخ‌های آنتی‌اکسیداتیو و کاهش ROS نیز نشان داده



(الف)



(ب)

شکل ۵. نمودار میله‌ای (الف) و شبکه (ب) اجزای سلولی ژن‌های با بیان کاهش یافته حاصل از تیمار اتانول در شرایط تنش خشکی توسط ابزار ShinyGO

Figure 5. Bar chart (A) and network analysis (B) of cellular components associated with down-regulated genes induced by ethanol treatment under drought stress conditions using the ShinyGO tool

اکسیداتیو را کاهش می‌دهد. این پاسخ‌ها در بسیاری از گونه‌ها از جمله آراییدوپسیس، برنج و سویا مشاهده شده‌اند (Rahman *et al.*, 2022). نتایج نشان داد ژن‌های تغییر بیان یافته در فرایندهای زیستی مرتبط با تنش خشکی نقش داشتند که می‌تواند نقش مهمی در پاسخ به تنش ایفا کند. تغییرات شدید در دسترسی به آب در تنش خشکی سبب می‌شود دسترسی اکسیژن به گیاهان محدود شده و به هیپوکسی منجر شود. در گیاهان، فاکتورهای رونویسی گروه VII پاسخ‌دهنده به اتیلین (ERFVIIها) تغییرات رونویسی را در شرایط هیپوکسی القا می‌کنند. اتیلین در گیاهان در زمان غرقابی محبوس شده و باعث فعال‌سازی مسیرهای علامت‌دهی برای سازگاری با هیپوکسی می‌شود (Tamura and

هم‌چنین تبدیل سریع اتانول و اسیداستیک به استیل-CoA موجب افزایش استیلاسیون هیستون‌ها (مانند هیستون H4) شده و تغییرات اپی‌ژنتیکی را در ژن‌های مرتبط با تحمل تنش‌های خشکی ایجاد می‌کند (Bashir *et al.*, 2025).

علاوه بر این مطالعات در گیاهان زراعی مثل کاساوا نشان داده‌اند که اتانول پیش‌درمانی باعث القای هم‌زمان ژن‌های *PP2C* و *AITR* و پروتئین‌های HSP می‌شود که این هم‌پوشانی ژنتیکی، پاسخ محافظتی مضاعف در شرایط آب‌کم را رقم می‌زند (Vu *et al.*, 2022). هم‌چنین، اتانول با تقویت مسیرهای آنتی‌اکسیدانی نظیر CAT و APX و POD و هم‌چنین تنظیم بیان TFهای استرس‌محور هم‌چون *ZAT10* و *ZAT12* فشار

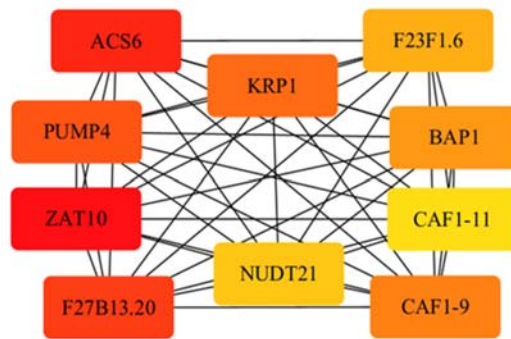
مختلف از طریق مکانیسم‌های برش و مهار ترجمه کنترل می‌شوند. برخی از این miRNAها فقط یک ژن و برخی به‌صورت مشترک ژن‌های هدف را تنظیم می‌کردند (شکل ۷). نتایج نشان داد که ژن *KRP1* تحت تنظیم-microRNAهایی از جمله *ath-miR854a*، *ath-miR5653* و *ath-miR855* با مکانیسم برش و *ath-miR854b*، *ath-miR854c*، *ath-miR854d* و *ath-miR854e* با مکانیسم مهار ترجمه قرار دارد. همچنین ژن *ZAT10* تحت کنترل microRNAهایی شامل *ath-miR159a*، *ath-miR8181*، *ath-miR403-5p*، *ath-miR159c*، *ath-miR159b-3p*، *ath-miR2933a*، *ath-miR2933b* و *ath-miR830-3p* قرار دارد که همگی توسط مکانیسم برش mRNA کنترل می‌شوند (شکل ۷).

نتایج نشان داد ژن *CAF1-9* توسط میکروRNAهای *ath-miR5647*، *ath-miR5025*، *ath-miR829-5p* و *ath-miR419* از طریق مکانیسم برش و نیز *ath-miR5021* از طریق مکانیسم مهار ترجمه تنظیم می‌شود. همچنین نتایج نشان داد ژن *ACS6* توسط microRNAهای *ath-miR3440b-3p*، *ath-miR5640*، *ath-miR829-3p.2* و *ath-miR5629* از طریق مکانیسم برش تنظیم می‌شوند. ژن *PUMP4* نیز توسط microRNAهای *ath-miR414*، *ath-miR5652*، *ath-miR156j*، *ath-miR156i*، *ath-miR5649b* و *ath-miR5649a*، *ath-miR5021* توسط مکانیسم برش تنظیم می‌شود (شکل ۷).

F27B13.20 تحت کنترل مجموعه‌ای از microRNAها شامل *ath-miR1886.3*، *ath-miR5027*، *ath-miR447c-3p*، *ath-miR5017-5p*، *ath-miR157b*، *ath-miR157a-5p*، *ath-miR5998b*، *ath-miR5025*، *ath-miR157c-5p*، *ath-miR870-5p* قرار دارد که بیان این ژن را از طریق مکانیسم برش تنظیم می‌کنند. همچنین miRNAهای *ath-miR5998a* و *ath-miR837-5p* را از طریق مکانیسم مهار ترجمه مورد تنظیم قرار می‌دهند (شکل ۷). همچنین نتایج نشان داد ژن

(Bono. 2022). تیمار با اتانول باعث بسته‌شدن روزنه‌ها می‌شود که در نتیجه آن، نرخ تعرق کاهش می‌یابد و محتوای آب برگ در شرایط تنش خشکی افزایش پیدا می‌کند و اتلاف آب ناشی از خشکی به تأخیر می‌افتد (Bashir et al., 2022).

تعداد ۱۰ ژن شامل (*KRP1* kip related Zinc Finger) *ZAT10*، (AT4G27280، protein *CAF1-9*، (Antioxidant 10، AT1G27730 CCR4-associated factor 1، AT3G44260) *ACC*، (AT4G11280) *ACS6*، (homolog PMP4—، AT4G24570) *PUMP4*، (Synthase (Plasma Membrane Intrinsic Protein 4 *CAF1-11*، (AT4G29780) *F27B13.20* CCR4-Associated Factor 1-11، AT5G22250) Arabidopsis Protein، AT2G30020) *F23F1.6*، (Nudix) *NUDT21*، (Phosphatase 2C 1 *BAP1* و (AT1G73540، Hydrolase 21 BON ASSOCIATION، AT3G61190) *PROTEIN 1* به‌عنوان ژن‌های کلیدی شناسایی شدند (شکل ۶).



شکل ۶. ژن‌های کلیدی شناسایی شده در تیمار اتانول پس از تنش خشکی گیاه آرابیدوپسیس

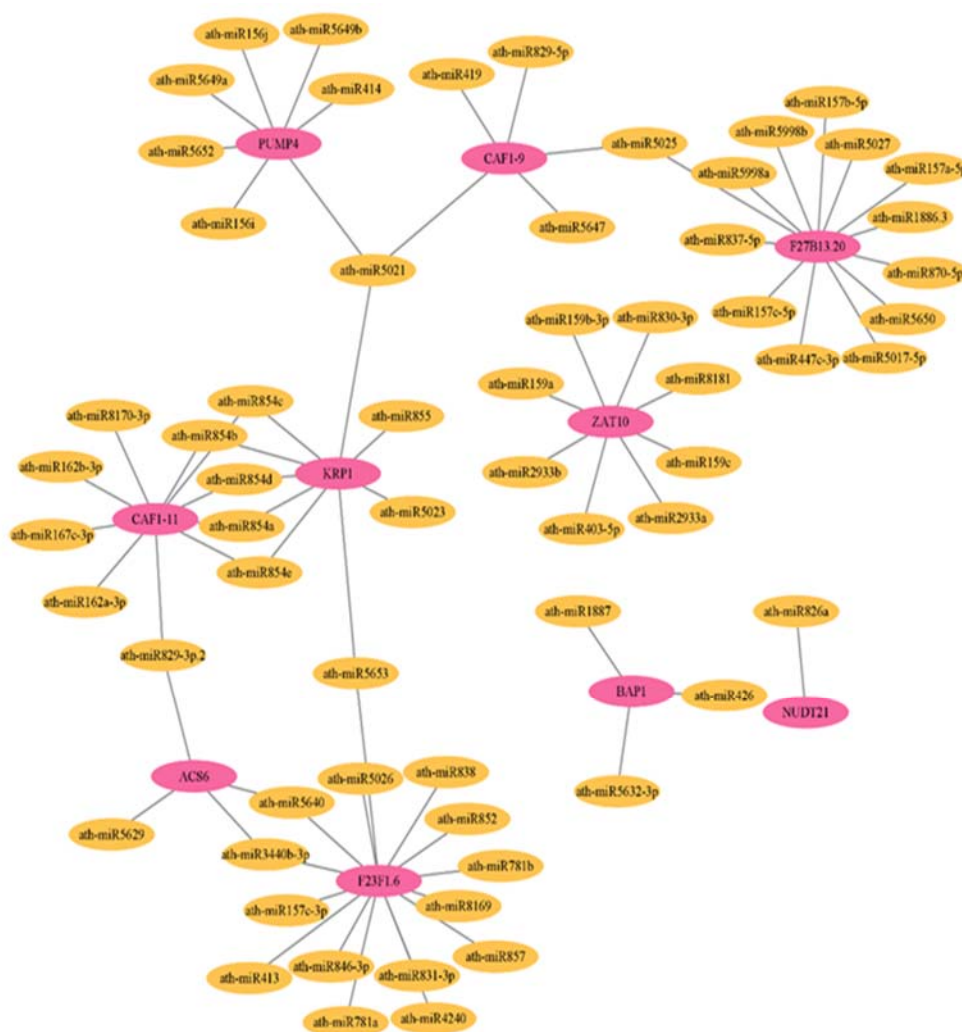
Figure 6. identified Key genes in Arabidopsis induced by ethanol treatment under drought stress

نتایج تحلیل پیش‌بینی روابط تنظیمی microRNA-mRNA نشان داد که ژن‌های کلیدی شناسایی شده در این پژوهش توسط ۶۳ نوع miRNA

ath-miR852 و ath-miR846-3p miR8169 توسط مکانیسم برش و توسط ath-microRNAهای ath-miR838 و ath-miR831-3p miR5026 توسط مکانیسم مهار ترجمه کنترل می‌شود (شکل ۷).

هم‌چنین نتایج نشان داد ژن کلیدی *NUDT21* تنها توسط ath-miR826a از طریق مکانیسم برش و ژن *BAP1* توسط ath-microRNAهای ath-miR1887 و ath-miR5632-3p توسط مکانیسم برش و ath-miR426 توسط مکانیسم مهار ترجمه تنظیم می‌شود (شکل ۷).

CAFI-11 توسط مجموعه‌ای از microRNAهای ath-miR8170- ath-miR167c-3p ath-miR162b-3p ath-miR162a-3p ath-miR854b ath-miR854a ath-miR829-3p.2 ath-miR854e و ath-miR854d ath-miR854c توسط مکانیسم برش کنترل می‌شود. ژن *F23F1.6* نیز توسط مجموعه‌ای گسترده از microRNAها شامل ath-miR781a ath-miR157c-3p miR413 ath-miR3440b-3p ath-miR857 miR781b ath-miR5653 ath-miR5640 ath-miR4240



شکل ۷. شبکه تنظیمی miRNA و ژن‌های کلیدی پاسخ‌دهنده به تیمار اتانول پس از تنش خشکی در آرابیدوپسیس

Figure 7. Regulatory network of miRNAs and key genes responsive to ethanol treatment under drought stress in Arabidopsis

هم‌چنین در بافت‌زایی فلوئم یا زایلیم نقش دارد (Liang *et al.*, 2021). تنش کادمیوم موجب افزایش قابل توجه تولید اتیلن در ریشه‌های *Arabidopsis* شد. افزایش ناگهانی اتیلن ناشی از کادمیوم به دلیل افزایش بیان ژن‌های 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-ACETYLTRANSFERASE (ACS) CARBOXYLIC ACID SYNTHASE MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 6 (MAPK6) در ریشه‌های *Arabidopsis* فعال می‌شود. در این میان، ACS2 و ACS6، به ویژه ACS2، در تولید اتیلن القاشده توسط MAPK6 تحت تنش کادمیوم نقش دارند و می‌توانند نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های محیطی ایفا کنند (Tu *et al.*, 2025). پروتئین‌های MAPK یکی از مهم‌ترین راه‌های انتقال پیام در گیاهان هستند. این پروتئین‌ها به گیاه کمک می‌کنند تا پیام‌هایی که از محیط دریافت می‌کند را به درون سلول منتقل کند و واکنش مناسب نشان دهد (Danquah *et al.*, 2014). هم‌چنین نتایج نشان داد ژن ACS6 توسط microRNAهای مهمی همچون ath-miR829-3p.2 از طریق مکانیسم برش تنظیم می‌شود. مشخص شده است که ath-miR829-3p.2 می‌تواند ژن‌های مرتبط با خشکی را تنظیم کند (Zhakypbek *et al.*, 2025).

نتایج نشان داد ژن‌های PUMP4 و F27B13.20 ژن‌های کلیدی بوده (شکل ۶) و در پاسخ سلولی به هیپوکسی نقش دارند (پیوست). ژن PUMP4 توسط microRNAهای مهم مرتبط با تنش‌های محیطی همچون ath-miR156i، ath-miR414، ath-miR156j و ath-miR838 تنظیم می‌شود (شکل ۷). miR156 در گیاهان مختلف، از جمله یونجه، گوجه فرنگی، گندم و چای در پاسخ به تنش‌های خشکی، شوری و گرما نقش حفاظتی دارد و با تنظیم مسیرهای بیوسنتزی، تحمل گیاه به این شرایط استرس‌زا را افزایش می‌دهد (Arshad *et al.*, 2024; Ruan *et al.*, 2017). مطالعات بیوانفورماتیک اخیر نشان داده‌اند که microRNAهای ath-miR838 و ath-miR414 دارای پتانسیل قوی برای تنظیم تعداد زیادی ژن هستند،

ژن‌های *KRP1* و *ZAT10* ژن‌های کلیدی شناسایی شده بودند. آنالیزها نشان داد که ژن *KRP1* در پاسخ به اسید آسبیزیک نقش دارد (پیوست). هم‌چنین ژن *ZAT10* در پاسخ سلولی به هیپوکسی، کمبود آب، اسید آسبیزیک، زخمی شدن گیاه، سرما، تنش شوری، استرس اکسیداتیو، پاسخ به کیتین و تنظیم منفی رونویسی با الگوی DNA نقش دارد (Kankainen *et al.*, 2006). نتایج نشان داد ژن *KRP1* تحت تنظیم microRNAهای مهمی همچون ath-miR855 و ath-miR854a قرار می‌گیرد. در گیاه مدل *Arabidopsis thaliana* ath-miR855 به‌عنوان یکی از miRNAهای حساس به تنش‌های غیرزیستی شناسایی شده است (Pegler *et al.*, 2019). هم‌چنین خانواده miR854 در تنش خشکی تغییر بیان نشان داده و در پاسخ به تنش نقش دارد (Zhakypbek *et al.*, 2025).

هم‌چنین نتایج نشان داد برخی از اعضای microRNA خانواده ۱۵۹ ژن *ZAT10* را کنترل می‌کنند (شکل ۷). miR159 در گیاهان مختلف تحت تنش خشکی و شوری تنظیم می‌شود. در گوجه‌فرنگی با هدف‌گیری فاکتورهای MYB موجب تجمع ترکیبات اسموتیکی محافظ و در *Populus* با کاهش باز بودن روزنه و بهبود کارایی مصرف آب، مقاومت به خشکی را افزایش می‌دهد (López-Galiano *et al.*, 2019; Millar *et al.*, 2019; Fu *et al.*, 2023).

نتایج نشان داد ژن کلیدی دیگر ژن *CAFI-9* بود. این ژن حساس به علامت‌دهی ناشی از تنش بوده و می‌تواند در مسیرهای تنظیمی مرتبط با پاسخ‌های تنش نقش داشته باشد (Fang *et al.*, 2023). نتایج نشان داد ژن *CAFI-9* توسط microRNAهای مرتبط با پاسخ به تنش‌های محیطی مانند ath-miR5021 از طریق مکانیسم مهار ترجمه تنظیم می‌شود. ath-miR5021 یکی از microRNAهای بسیار مهم پاسخ‌دهنده به تنش خشکی است (Pasandideh *et al.*, 2023). ژن دیگری که به‌عنوان ژن کلیدی شناسایی شد ژن *ACS6* بود. ژن *ACS6* در پاسخ به کم‌آبی، زخم، پاسخ زیستی به هورمون اکسین، پاسخ به تنش اکسیداتیو، پاسخ دفاعی و

ath-miR829-2016). هم‌چنین مطالعات نشان می‌دهد -miR829-2016 در گیاه *Arabidopsis thaliana* ژن‌هایی مانند اعضای خانواده MYB را که با پاسخ به خشکی مرتبط هستند، تنظیم می‌کند (Zhakypbek et al., 2025). خانواده miR854 از جمله miRNAهای دارای پتانسیل تنظیم گسترده ژن‌ها و مرتبط با تحمل خشکی هستند. در گیاه *Camellia sinensis* تغییر بیان miR854 تحت شرایط خشکی مشاهده شده است که تأییدکننده نقش این خانواده در پاسخ به تنش کم آبی است (Zhakypbek et al., 2025; Guo et al., 2017).

ژن کلیدی دیگر *F23F1.6* بود که در پاسخ به زخمی شدن و مسیر سیگنالینگ فعال شده با اسید آبسزیک نقش دارد. وقتی گیاه در شرایط سختی مثل خشکی یا شوری قرار می‌گیرد، واکنش‌های مختلفی در آن اتفاق می‌افتد که می‌تواند شامل تغییرات در سلول‌ها، بیان ژن‌ها و کل ساختار گیاه باشد. در این حالت، هورمون ABA افزایش می‌یابد. این هورمون باعث می‌شود ژن‌هایی که به گیاه کمک می‌کنند با شرایط سخت کنار بیایند، فعال شوند. مشخص شده است که مسیرهای ABA با مسیرهای دیگر مثل مسیر MAPK و مسیرهایی که در تنظیم پاسخ‌های گیاه به تنش‌های محیطی مهم هستند ارتباط دارند (Danquah et al., 2014).

هم‌چنین نتایج نشان داد ژن *F23F1.6* نیز توسط مجموعه‌ای گسترده از microRNAهای مرتبط با تنش‌های محیطی تنظیم می‌شود (شکل ۷). در مطالعه‌ای روی کلزا، miR413 به‌عنوان miRNA پاسخ‌دهنده به تنش شناسایی شد و در تحلیل‌های بیوانفورماتیک نیز به‌عنوان کاندیدای تنظیم‌کننده ژن‌های مرتبط با خشکی معرفی گردید (Pasandideh et al., 2023). در *Arabidopsis thaliana* تحت شرایط کمبود نیتروژن نیز miR781 به‌عنوان miRNA پاسخ‌دهنده به تنش تغذیه‌ای گزارش شد (Sakuraba et al., 2024). هم‌چنین بیان ath-miR857 در شرایط تنش خشکی/اسموتیک کاهش یافت و افزایش بیان ژن هدف آن (*LAC7*) مشاهده شد، یافته‌ای که نقش احتمالی این

از جمله ژن‌هایی که در پاسخ به تنش‌های محیطی نقش دارند (Zhakypbek et al., 2025).

نتایج نشان داد ژن *F27B13.20* تحت کنترل ath-miR5017-5 است که بیان این ژن را از طریق مکانیسم برش تنظیم می‌کند. در مطالعه‌ای روی سیب‌زمینی، ایزومرهای وابسته به خانواده ath-MIR5017 شناسایی شدند که با هدف‌گیری کینازهای وابسته به SNF1 و اثرگذاری بر HMG-CoA Reductase، به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های احتمالی بیوستز آلکالوئیدهای استروئیدی دفاعی پیشنهاد شده‌اند (Qiao et al., 2023).

از دیگر ژن‌های کلیدی ژن *CAFI-11* بود که در اتصال به پروتئین و فعالیت ریبونوکلئازی اختصاصی poly(A) نقش دارد (شکل ۶). عوامل طولیل شدن رونویسی به RNA پلیمراز II (RNAPII) متصل می‌شوند تا کارایی تولید mRNA را کنترل کنند و در نتیجه رشد و توسعه گیاه را تنظیم نمایند. در طول فرایند رونویسی، موانعی مانند نوکلئوزوم‌ها یا توالی‌های خاص DNA ممکن است باعث توقف و عقب‌گرد RNAPII شوند. عامل طولیل شدن TFIIIS به پلیمراز کمک می‌کند تا RNA را به‌طور مؤثری برش داده و از این توقف خارج شود (Antosz et al., 2020).

نتایج نشان داد ژن *CAFI-11* توسط مجموعه‌ای از microRNAهای مهم مرتبط با تنش همچون ath-miR162b، ath-miR162a-3p، miR167c-3p، ath-miR854b، ath-miR854a، 3p، ath-miR854c، ath-miR854d و ath-miR854e کنترل می‌شود. در بررسی گسترده microRNAها و پاسخ آن‌ها به تنش مشخص شده است که خانواده miR167 جزو microRNAهایی است که ممکن است در تنظیم پاسخ به تنش‌های غیرزیستی از جمله خشکی نقش داشته باشد (Covarrubias et al., 2010). در گیاه *Arabidopsis thaliana* تولید miR162a تحت تنش خشکی افزایش می‌یابد. این افزایش ناشی از تغییر در فرایند پردازش pri-miR162a است و هم‌چنین پروموتورهای MIR162a و MIR162b حاوی عناصر پاسخ‌دهنده به خشکی هستند (Barciszewska-Pacak et al., 2010).

با ساعت زیستی و مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط، مکانیسم‌های اصلی مدیریت پاسخ‌های گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی را تشکیل می‌دهند (Jimenez *et al.*, 2021). ژن *BAP1* توسط microRNAهای مهمی همچون *ath-miR426* تنظیم می‌شود (شکل ۷). *ath-miR426* به‌عنوان miRNA تنظیم‌کننده بالقوه معرفی شده است که در مسیر سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن، می‌تواند نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های خشکی و اکسیداتیو ایفا کند (Zhakypbek *et al.*, 2025).

یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که تیمار اتانول با فعال‌سازی مجموعه‌ای از ژن‌های کلیدی شامل *CAF1-11*, *PUMP4*, *ZAT10*, *ACS6*, *KRP1* و *CAF1-9*, *F23F1.6*, *NUDT21*, *BAP1* و *F27B13.20* سازوکارهای مختلفی را برای افزایش تحمل گیاه/آرابیدوپسیس به خشکی تحریک می‌کند. یکی از مهم‌ترین این مکانیسم‌ها، تنظیم روزنه‌ها از طریق فعال‌سازی مسیرهای مرتبط با ABA است. به‌طوری‌که اتانول با تحریک مسیر سیگنال‌دهی ABA باعث بسته‌شدن روزنه‌ها و کاهش اتلاف آب از طریق تعرق می‌شود (Bashir *et al.*, 2022; Vu *et al.*, 2022). از سوی دیگر، فعال‌سازی ژن‌های مرتبط با دفاع آنتی‌اکسیدانی مانند *ZAT10* موجب افزایش فعالیت آنزیم‌هایی نظیر APX، CAT و POD شده و به خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در شرایط خشکی کمک می‌کند. این مکانیسم به‌طور گسترده در گیاهانی که با اتانول تیمار شده‌اند گزارش شده است (Rahman *et al.*, 2022; Bashir *et al.*, 2022). همچنین اتانول با افزایش سنتز اسمولیت‌هایی مانند قندهای محلول و آمینواسیدها، فشار اسمزی سلول‌ها را حفظ کرده و مانع از دست‌رفتن آب در طی خشکی می‌شود (Rahman *et al.*, 2022). علاوه بر این، اتانول مسیرهای مرتبط با بیوسنتز گلیکوزینولات‌ها و متابولیسم فیل‌پروپانوئید را نیز تحریک می‌کند که موجب تقویت ترکیبات دفاعی ثانویه، پایداری بیشتر دیواره سلولی و کاهش آسیب‌پذیری گیاه در برابر خشکی می‌شود

miRNA را در تنظیم ساختار دیواره سلولی و سازوکارهای سازگاری گیاه با تنش کم‌آبی تأیید می‌کند (Pegler *et al.*, 2019). در گیاهان مختلف، از جمله پنبه و گوجه‌فرنگی miR157 به‌عنوان یک miRNA پاسخ‌دهنده به تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، شوری و گرما شناسایی شده است، به‌طوری‌که در پنبه تحت خشکی کاهش بیان نشان داد و در گوجه‌فرنگی نیز تغییر بیان قابل‌توجهی مشاهده شد (Xie *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2020).

یکی دیگر از ژن‌های کلیدی شناسایی شده در این پژوهش ژن *NUDT21* بود. در مطالعه‌ای بیان نامناسب *NUDT* موجب القای پاسخ‌های موضعی کمبود فسفات شد. تحلیل RNA-seq در گیاهان نوع وحشی و موتانت‌های *NUDT* نشان داد که این ژن در تنظیم دفاع گیاهی بسیار مهم است (Schneider *et al.*, 2024). همچنین نتایج نشان داد ژن کلیدی *NUDT21* توسط *ath-miR826a* تنظیم می‌شود (شکل ۷). در *Arabidopsis thaliana* miR826 به‌عنوان یک miRNA پاسخ‌دهنده به کمبود نیتروژن شناسایی شده است، به‌طوری‌که در شرایط کاهش نیتروژن بیان آن افزایش می‌یابد (Liang *et al.*, 2013).

یکی دیگر از ژن‌های کلیدی شناسایی شده ژن *BAP1* بود. این ژن در پاسخ به زخم، پاسخ به سرما و گرما و پاسخ زیستی دفاعی نقش دارد (پیوست). ژن *BAP1* به‌عنوان مهارکننده عمومی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی شناسایی شده است (Yang *et al.*, 2007). تحلیل‌های ترنسکرپتومی نشان داد که افزایش طول دوره نوری سبب تغییر بیان ژن‌های نشانگر استرس نوری-نوری مانند *BAP1* و *ZAT12* شد (Rober Terstegen, 2024). در گیاهان پاسخ به تنش‌های محیطی با فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ هورمونی در سلول‌ها و بافت‌های خاص مدیریت می‌شود (Waadt *et al.*, 2022). برای درک سازگاری گیاهان با تنش‌های محیطی، شناسایی سازوکارهای مولکولی و پاسخ‌دهی به محرک‌های محیطی ضروری است. پیام‌رسان‌های ثانویه مانند کلسیم، گونه‌های فعال اکسیژن و هورمون‌ها، همراه

به‌عنوان گره‌های مرکزی در کنترل هم‌زمان چندین ژن هستند و درک شبکه‌های تنظیمی پیچیده را تسهیل می‌کند. نتایج نشان داد اتانول با القای یک شبکه ژنتیکی هماهنگ که فرایندهای فیزیولوژیکی، متابولیکی و اپی‌ژنتیکی را پوشش می‌دهد، توانست به‌طور مؤثر تحمل آرابیدوپسیس به خشکی را ارتقا دهد. این نتایج نشان می‌دهد که اتانول می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی ساده، ارزان و سازگار با محیط‌زیست جایگزینی برای روش‌های پرهزینه اصلاح ژنتیکی در مدیریت تنش خشکی در گیاهان باشد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که اتانول می‌تواند با تغییرات گسترده در بیان ژن‌ها و فعال‌سازی مسیرهای مختلف سیگنال‌دهی، نقش مهمی در افزایش تحمل گیاه آرابیدوپسیس *تالیانا* به تنش خشکی ایفا کند. تحلیل ترانسکریپتومی داده‌ها نشان داد که تیمار اتانول موجب تغییر بیان ۱۱۴۴ ژن شد که شامل ۵۶۷ ژن با افزایش بیان و ۵۷۸ ژن با کاهش بیان بود. در میان این ژن‌ها، ۱۰ ژن کلیدی شامل *ZAT10*، *ACS6*، *KRP1*، *F23F1.6*، *CAF1-9*، *CAF1-11*، *PUMP4* و *NUDT21* شناسایی شدند که هر کدام در بخشی از سازوکارهای دفاعی گیاه نقش اساسی دارند. فعال‌سازی ژن‌هایی مانند *ACS6* و تحریک مسیر اتیلن، به تنظیم رشد و پاسخ سریع گیاه به کم‌آبی کمک می‌کند. ژن *ZAT10* با نقش آنتی‌اکسیدانی خود، موجب تقویت سیستم دفاعی علیه گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود و از آسیب سلولی در اثر تنش خشکی جلوگیری می‌کند. ژن‌های مرتبط با مسیر ABA مانند *KRP1* و *F23F1.6* نیز در تنظیم روزنه‌ها، کاهش تعرق و حفظ محتوای آب برگ مؤثر هستند. علاوه بر این، ژن‌هایی مانند *PUMP4* در حفظ تعادل اسمزی و انتقال آب نقش دارند و ژن‌های گروه *CAF1* در تنظیم پایداری mRNA و تقویت پاسخ‌های تنظیمی نقش آفرینی می‌کنند. نتایج هم‌چنین نشان داد که اتانول مسیرهای مهمی شامل بیوسنتز گلیکوزینولات‌ها، پاسخ آنتی‌اکسیدانی، متابولیسم فنیل‌پروپانوئید، مسیرهای

(Bashir *et al.*, 2022). هم‌چنین اتانول از طریق فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی و تثبیت پروتئین‌ها در شرایط استرس، مانع تجمع پروتئین‌های تاخوردن‌شده شده و سلامت سلول را حفظ می‌کند (Todaka *et al.*, 2024; Bashir *et al.*, 2025). در مجموع، اتانول با هماهنگ‌سازی این مسیرهای فیزیولوژیکی و مولکولی از جمله تنظیم هورمونی، دفاع آنتی‌اکسیدانی، حفظ تعادل اسمزی، تثبیت ساختار سلولی و محافظت پروتئینی، توان گیاه را برای اجتناب از خشکی (کاهش تعرق) و تحمل خشکی (حفظ عملکرد سلولی در کم‌آبی) افزایش می‌دهد. این نتایج کاملاً با گزارش‌های موجود در مطالعات پیشین مطابقت دارد و نقش چندجانبه اتانول در بهبود مقاومت گیاهان به خشکی را تأیید می‌کند (Bashir *et al.*, 2022; Vu *et al.*, 2022; Rahman *et al.*, 2022).

از سوی دیگر، برخی از ژن‌های شناسایی‌شده نظیر *NUDT21* و *BAP1* در مسیرهای دفاعی عمومی گیاهان در برابر تنش‌های محیطی فعال بودند و این نشان می‌دهد که اتانول علاوه بر نقش مستقیم در متابولیسم و تنظیم هورمون‌ها، به‌طور غیرمستقیم از طریق تغییرات در شبکه‌های دفاعی گسترده‌تر نیز موجب افزایش مقاومت می‌شود (Bashir *et al.*, 2022; Vu *et al.*, 2022; Rahman *et al.*, 2022).

تحلیل شبکه‌های تنظیمی microRNA-mRNA نشان داد که برخی microRNAها در چند ژن مشترک بوده و به‌عنوان نقاط اتصال میان مسیرهای تنظیمی عمل می‌کنند. به‌عنوان مثال ath-miR5025 میان ژن‌های *F27B13.20* و *CAF1-9* مشترک بود، درحالی‌که ath-miR3440b-3p و ath-miR5640 هم‌زمان ژن‌های *F23F1.6* و *ACS6* را هدف قرار می‌دهند. هم‌چنین ath-miR5653 در *F23F1.6* و *KRP1* و ath-miR5021 در *PUMP4*، *CAF1-9* و *KRP1* فعالیت می‌کنند، که نقش مرکزی این miRNAها در شبکه تنظیمی را نشان می‌دهد. اعضای خانواده (a-e) miR854 نیز در *KRP1* و *CAF1-11* به‌صورت مشترک عمل می‌کنند و ath-miR829-3p.2 میان *CAF1-11* و *ACS6* مشترک است. این یافته‌ها بیانگر هم‌پوشانی تنظیمی و نقش برخی miRNAها

به‌طور کلی، یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که کاربرد اتانول به‌صورت برون‌زا می‌تواند از طریق تنظیم گسترده بیان ژن، فعال‌سازی شبکه‌های پاسخ به تنش و تقویت مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و مولکولی و تنظیمی مرتبط با خشکی، تحمل گیاهان را به شرایط کم‌آبی به‌طور مؤثری افزایش دهد. با توجه به ارزان‌بودن، در دسترس بودن و زیست‌سازگار بودن اتانول، استفاده از آن می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی عملی و جایگزین مناسب برای روش‌های پرهزینه اصلاح ژنتیکی و فناوری‌های پیشرفته در مدیریت تنش خشکی پیشنهاد شود.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

References

- Antosz, W., Deforges, J., Begcy, K., Bruckmann, A., Poirier, Y., Dresselhaus, T., & Grasser, K. D. (2020). Critical role of transcript cleavage in Arabidopsis RNA polymerase II transcriptional elongation. *The Plant Cell*, 32(5), 1449-1463.
- Arshad, M., Feyissa, B. A., Amyot, L., Aung, B., & Hannoufa, A. (2017). MicroRNA156 improves drought stress tolerance in alfalfa (*Medicago sativa*) by silencing SPL13. *Plant science*, 258, 122-136.
- Barciszewska-Pacak, M., Milanowska, K., Knop, K., Bielewicz, D., Nuc, P., Plewka, P., ... & Szwejkowska-Kulinska, Z. (2015). Arabidopsis microRNA expression regulation in a wide range of abiotic stress responses. *Frontiers in plant science*, 6, 410.
- Bashir, K., Todaka, D., Rasheed, S., Matsui, A., Ahmad, Z., Sako, K., ... & Seki, M. (2022). Ethanol-mediated novel survival strategy against drought stress in plants. *Plant and Cell Physiology*, 63(9), 1181-1192.
- Bashir, K., Todaka, D., Sako, K., Ueda, M., Aziz, F., & Seki, M. (2025). Chemical application improves stress resilience in plants. *Plant Molecular Biology*, 115(2), 47.
- Cai, G., Zang, Y., Wang, Z., Liu, S., & Wang, G. (2024). Arabidopsis BTB-A2s Play a Key Role in Drought Stress. *Biology*, 13(8), 561.
- Chandrashekar, H. K., Singh, G., Kaniyassery, A., Thorat, S. A., Nayak, R., Murali, T. S., & Muthusamy, A. (2023). Nanoparticle-mediated amelioration of drought stress in plants: a systematic review. *3 Biotech*, 13(10), 336.
- Covarrubias, A. A., & Reyes, J. L. (2010). Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant, Cell & Environment*, 33(4), 481-489.
- Danquah, A., De Zélicourt, A., Colcombet, J., & Hirt, H. (2014). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology advances*, 32(1), 40-52.
- Fang, H., Yu, Z., Xing, K., Zhou, L., Shao, Y., Zhang, X., ... & Zhang, L. (2023). Transcriptomic analysis reveals the functions of H2S as a gasotransmitter independently of Cys in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1184991
- Forouzandeh, M., Parsa, S., Mahmoodi, S., & IZANLOO, A. (2024). Physiological, biochemical, and molecular responses of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to elicitors under drought stress. *Plant Molecular Biology Reporter*, 42(3), 515-531.
- Fu, T., Wang, C., Yang, Y., Yang, X., Wang, J., Zhang, L., ... & Wang, Y. (2023). Function identification of miR159a, a positive regulator during poplar resistance to drought stress. *Horticulture Research*, 10(12), uhad221.
- Guo, Y., Zhao, S., Zhu, C., Chang, X., Yue, C., Wang, Z., ... & Lai, Z. (2017). Identification of drought-responsive miRNAs and physiological characterization of tea plant (*Camellia sinensis* L.) under drought stress. *BMC plant biology*, 17(1), 211.

- Jiménez, A., Sevilla, F., & Martí, M. C. (2021). Reactive oxygen species homeostasis and circadian rhythms in plants. *Journal of Experimental Botany*, 72(16), 5825-5840.
- Kankainen, M., Brader, G., Törönen, P., Palva, E. T., & Holm, L. (2006). Identifying functional gene sets from hierarchically clustered expression data: map of abiotic stress regulated genes in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic acids research*, 34(18), e124-e124.
- Liang, G., Li, Y., He, H., Wang, F., & Yu, D. (2013). Identification of miRNAs and miRNA-mediated regulatory pathways in *Carica papaya*. *Planta*, 238(4), 739-752.
- Liang, Y., Tabien, R. E., Tarpley, L., Mohammed, A. R., & Septiningsih, E. M. (2021). Transcriptome profiling of two rice genotypes under mild field drought stress during grain-filling stage. *AoB Plants*, 13(4), plab043.
- López-Galiano, M. J., García-Robles, I., González-Hernández, A. I., Camañes, G., Vicedo, B., Real, M. D., & Rausell, C. (2019). Expression of miR159 is altered in tomato plants undergoing drought stress. *Plants*, 8(7), 201.
- Millar, A. A., Lohe, A., & Wong, G. (2019). Biology and function of miR159 in plants. *Plants*, 8(8), 255.
- Mohsenzadeh Golfazani, M., Pasandideh Arjmand, M., Hassani Kumleh, S. H., Samizadeh Lahiji, H., Vahedi, R., & Ramezanzadeh Bishegahi, S. (2019). The effect of iron toxicity on some of morphological traits, relative gene expression of *G6PDH* and peroxidase enzyme activity in resistant and susceptible genotypes of Rice (*Oryza sativa*). *Cereal Research*, 9(3), 207-220. (In Persian)
- Mohsenzadeh Golfazani, M., Pasandideh Arjomand, M., & Samizadeh Lahiji, H. (2022). Bioinformatic identification of key genes involved in osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Agricultural Biotechnology Journal*, 14(1), 155-174. (In Persian)
- Mousavi, S. M., Akbarpour, V., Moradi, H., & Sadeghi, H. (2021). Effect of methanol and ethanol foliar application on some growth characteristics and some of secondary metabolites thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Journal of Plant Production Research*, 28(1), 213-229.
- Pasandideh Arjmand, M., Samizadeh Lahiji, H., & Mohsenzadeh Golfazani, M. (2017). The investigation of some photorespiration genes relative expression in response to drought stress in canola (*Brassica napus*). *Crop Biotechnology*, 6(3), 31-42. (In Persian)
- Pegler, J. L., Oultram, J. M., Grof, C. P., & Eamens, A. L. (2019). Profiling the abiotic stress responsive microRNA landscape of *Arabidopsis thaliana*. *Plants*, 8(3), 58.
- Qiao, Y., Yang, F., Li, Q., Ren, P., An, P., Li, D., & Xiao, J. (2023). Combined small RNA and degradome sequencing reveals important roles of light-responsive microRNAs in wild potato (*Solanum chacoense*). *Agronomy*, 13(7), 1763.
- Rahman, M. M., Mostofa, M. G., Das, A. K., Anik, T. R., Keya, S. S., Ahsan, S. M., ... & Tran, L. S. P. (2022). Ethanol positively modulates photosynthetic traits, antioxidant defense and osmoprotectant levels to enhance drought acclimatization in soybean. *Antioxidants*, 11(3), 516.
- Röber-Terstegen, V. M. (2024). *Priming and memory by photoperiod stress in Arabidopsis thaliana* (Doctoral dissertation).
- Ruan, S., Lin, J., Li, T., Wu, Y., Xu, C., Mu, L., ... & Si, H. (2024). Characterization of tae-miR156 (s) and their response to abiotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology*, 24(1), 1165.
- Sakuraba, Y., Yang, M., & Yanagisawa, S. (2024). HASTY-mediated miRNA dynamics modulate nitrogen starvation-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 15(1), 7913.
- Schneider, R., Lami, K., Prucker, I., Stolze, S. C., Strauß, A., Langenbach, K., ... & Schaaf, G. (2024). NUDIX Hydrolases Target Specific Inositol Pyrophosphates and Regulate Phosphate and Iron Homeostasis, and the Expression of Defense Genes in *Arabidopsis*. *bioRxiv*, 2024-10.
- Singh, A., Jain, D., Pandey, J., Yadav, M., Bansal, K. C., & Singh, I. K. (2023). Deciphering the role of miRNA in reprogramming plant responses to drought stress. *Critical reviews in biotechnology*, 43(4), 613-627.
- Tamura, K., & Bono, H. (2022). Meta-analysis of RNA sequencing data of *Arabidopsis* and rice under hypoxia. *Life*, 12(7), 1079.
- Todaka, D., Quynh, D. T. N., Tanaka, M., Utsumi, Y., Utsumi, C., Ezoe, A., ... & Seki, M. (2024). Application of ethanol alleviates heat damage to leaf growth and yield in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1325365.
- Tu, C. Y., Zheng, L., Yan, J., Shen, R. F., & Zhu, X. F. (2025). ACS2 and ACS6, especially ACS2 is involved in MPK6 evoked production of ethylene under Cd stress, which exacerbated Cd toxicity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 352, 112354.
- Vu, A. T., Utsumi, Y., Utsumi, C., Tanaka, M., Takahashi, S., Todaka, D., ... & Seki, M. (2022). Ethanol treatment enhances drought stress avoidance in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Molecular Biology*, 110(3), 269-285.

- Waadt, R., Seller, C. A., Hsu, P. K., Takahashi, Y., Munemasa, S., & Schroeder, J. I. (2022). Plant hormone regulation of abiotic stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(10), 680-694.
- Xie, F., Wang, Q., Sun, R., & Zhang, B. (2015). Deep sequencing reveals important roles of microRNAs in response to drought and salinity stress in cotton. *Journal of experimental botany*, 66(3), 789-804.
- Yang, H., Yang, S., Li, Y., & Hua, J. (2007). The Arabidopsis BAP1 and BAP2 genes are general inhibitors of programmed cell death. *Plant physiology*, 145(1), 135-146.
- Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z., & Chen, S. (2021). Response mechanism of plants to drought stress. *Horticulturae*, 7(3), 50.
- Yuan, L. B., Chen, L., Zhai, N., Zhou, Y., Zhao, S. S., Shi, L. L., ... & Xie, L. J. (2020). The anaerobic product ethanol promotes autophagy-dependent submergence tolerance in Arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7361.
- Zhakypbek, Y., Rakhmetullina, A., Kamarkhan, Z., Tursbekov, S., Shi, Q., Xing, F., ... & Belkozhayev, A. M. (2025). In Silico Analysis of miRNA-mRNA Binding Sites in *Arabidopsis thaliana* as a Model for Drought-Tolerant Plants. *Plants*, 14(12), 1800.
- Zhou, R., Yu, X., Ottosen, C. O., Zhang, T., Wu, Z., & Zhao, T. (2020). Unique miRNAs and their targets in tomato leaf responding to combined drought and heat stress. *BMC plant biology*, 20(1), 107.