

Bioinformatic evaluation of the microRNAs and their targeted genes associated with cotton (*Gossypium hirsutum*) susceptibility and resistance to *Verticillium dahliae*

Aminallah Tahmasebi^{1*}, Mohamad Hamed Ghodoum Parizipour²,
Amir Ghaffar Shahriari³

¹ Department of Agriculture, Minab Higher Education Center, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran, Email: a.tahmasbi@hormozgan.ac.ir

² Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

³ Department of Agriculture and Natural Resources, Higher Education Center of Eghlid, Eghlid, Iran

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:

Received: 18/9/2025

Accepted: 12/12/2025

Keywords:

Gossypium hirsutum
MicroRNAs
plant-pathogen
interaction
Verticillium dahliae

ABSTRACT

Background and objectives: MicroRNAs (miRNAs) are non-coding RNA molecules that serve as crucial regulators of plant defence responses during plant-pathogen interactions. The phytopathogenic fungus *Verticillium dahliae* causes verticillium wilt, leading to substantial reductions in cotton yield and fibre quality. To successfully infect host plants, this pathogen employs diverse mechanisms, including the secretion of cell wall-degrading enzymes and activation of virulence genes and effectors. In response, cotton (*Gossypium hirsutum*) deploys a range of defence strategies, such as lignin biosynthesis, callose deposition to reinforce cell walls, reactive oxygen species production, modulation of defense-related hormones, activation of defence gene expression, and gene silencing.

Materials and methods: In this study, comprehensive bioinformatic analyses were performed to identify miRNAs, their target genes, and the associated regulatory pathways involved in both susceptible and resistant responses of cotton to *V. dahliae*. Gene ontology analyses were conducted to characterise *biological* processes, cellular components, and molecular functions. Protein-protein interaction networks were constructed to identify key hub genes with the highest connectivity, representing central regulators of sensitivity and resistance in cotton. The study aimed to elucidate the roles of miRNAs in mediating cotton's resistance and susceptibility to *V. dahliae* through identification of their targets and associated regulatory pathways.

Results: A total of 778 and 563 cotton genes were uniquely regulated by miRNAs in resistant and susceptible responses, respectively, during the *G. hirsutum*-*V. dahliae* interaction, with 13 genes down-regulated in both responses. miRNA-mediated regulation primarily involved cleavage of target mRNAs. KEGG pathway analyses revealed that "circadian rhythm," "base excision repair," "motor proteins," and "plant hormone signal transduction" pathways were significantly associated with resistance, whereas "sulfur relay system,"

“arachidonic acid metabolism,” “steroid biosynthesis,” “glycosaminoglycan degradation,” and “sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis” were pivotal in susceptibility. Additionally, pathways related to lignin biosynthesis, jasmonic acid, and salicylic acid signalling were emphasised as central components of cotton resistance to *V. dahliae*.

Conclusion: This study highlights key regulatory miRNAs as potential biomarkers, alongside associated hub genes and pathways, that shape susceptible and resistant responses in *G. hirsutum* during interaction with *V. dahliae*. These findings provide a valuable framework for understanding miRNA-mediated regulation of cotton defence and offer targets for improving disease resistance.

Cite this article: Tahmasebi, A., Ghodoum Parizipour, M.H., Ghaffar Shahriari, A. (2024). Bioinformatic evaluation of the microRNAs and their targeted genes associated with cotton (*Gossypium hirsutum*) susceptibility and resistance to *Verticillium dahliae*. *Iranian Journal Cotton Researches*, 12 (2), 1-14.
10.22092/ijcr.2024.367070.1225



© The Author(s).

DOI: 10.22092/ijcr.2024.367070.1225

Publisher: Cotton Research Institute of Iran



بررسی بیوانفورماتیکی میکرو آر.ان.ای‌ها و ژن‌های هدف مرتبط با مقاومت و حساسیت پنبه

Verticillium dahliae (Gossypium hirsutum) به بیمارگر

امین‌اله طهماسبی^{۱*}، محمد حامد قدوم پاریزی پور^۲، امیر غفار شهریاری^۳

^۱ گروه مهندسی کشاورزی، مجتمع آموزش عالی میناب، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران، رایانامه: a.tahmasbi@hormozgan.ac.ir

^۲ گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران

^۳ گروه کشاورزی و منابع طبیعی، مرکز آموزش عالی اقلید، اقلید، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- پژوهشی	سابقه و هدف: miRNA ها توالی‌های آر.ان.ای غیر کد کننده هستند که به عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی پاسخ‌های دفاعی در برهمکنش‌های گیاه و بیمارگر عمل می‌کنند. قارچ بیمارگر گیاهی <i>Verticillium dahliae</i> باعث پژمردگی و رتیسلیومی در پنبه (<i>Gossypium hirsutum</i>) می‌شود که منجر به کاهش قابل توجهی در عملکرد پنبه و کیفیت الیاف می‌شود. این بیمارگر مکانیسم‌های مختلفی نظیر تولید آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی و فعال کردن ژن‌های پر آزاری و افکتورها را در جهت ایجاد آلودگی گیاه توسعه داده است. در پاسخ به آلودگی قارچی، گیاه پنبه مکانیسم‌های مختلفی از جمله تولید لیگنین و رسوب کالوز، انواع اکسیژن فعال، هورمون‌های دفاعی، بیان ژن‌های مرتبط با دفاع و خاموشی ژن را بکار می‌گیرد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۶/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۹/۲۱	مواد و روش‌ها: در این مطالعه، miRNA ها و ژن‌های هدف آن‌ها و مسیرهای دخیل در پاسخ‌های حساسیت و مقاومت پنبه به بیمارگر <i>V. dahliae</i> توسط روش‌های بیوانفورماتیکی ارزیابی و شناسایی شدند. سپس فرآیند زیستی، اجزای سلولی و عملکرد مولکولی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. برهمکنش پروتئین- پروتئین و رسم شبکه ژنی بیشترین تعداد پروتئین‌های هدف به عنوان کلیدی ترین ژن‌های هدف در پاسخ‌های حساسیت و مقاومت گیاه پنبه مورد بررسی قرار گرفتند. در این مقاله سعی شده است نقش miRNA های دخیل در مقاومت و حساسیت گیاه پنبه به بیمارگر قارچی <i>V. dahliae</i> با شناسایی ژن‌های هدف آن‌ها و مسیرهای تنظیمی دخیل در پاسخ‌های حساسیت و مقاومت مورد ارزیابی قرار گیرند.
واژه‌های کلیدی: بیمارگر گیاهی پنبه حساسیت مقاومت miRNA	یافته‌ها: نتایج نشان داد که تعداد ۷۷۸ و ۵۶۳ ژن در پنبه به طور اختصاصی تحت تأثیر miRNA های انتخاب شده در پاسخ‌های مقاومت و حساسیت گیاه در برابر <i>V. dahliae</i> قرار می‌گیرند. همچنین، در مجموع ۱۳ ژن مشترک بین پاسخ‌های مقاومت و حساسیت پنبه در پاسخ به آلودگی <i>V. dahliae</i> شناسایی شدند. مکانیسم بازدارندگی (تجزیه آر.ان.ای/بازدارندگی ترجمه) مرتبط با miRNA ها نشان داد که بیان

ژن عمدتاً توسط تجزیه آر.ان.ای‌های هدف کنترل می‌شود. با توجه به تجزیه و تحلیل KEGG، مسیرهای "چرخه شبانه روزی (Circadian rhythm)"، "ترمیم برش باز (Base excision repair)"، "پروتئین‌های حرکتی (Motor proteins)" و "انتقال سیگنال هورمون گیاهی" در مسیر مقاومت پنبه از اهمیت زیادی برخوردار بودند و مسیرهای "متابولیسم آراشیدونیک اسید"، "بیوسنتز استروئیدی"، "تجزیه گلیکوزآمینوگلیکان"، و "بیوسنتز تری ترپنوئید و سزکویی ترپنوئید" در پاسخ حساسیت پنبه به *V. dahliae* ضروری بود. همچنین بعضی از مسیرهای تنظیمی بر نقش بیوسنتز لیگنین و هورمون‌های جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید در مقاومت گیاه پنبه در برابر *V. dahliae* تاکید داشت.

نتیجه گیری: این نتایج، miRNA های دخیل در مقاومت و حساسیت پنبه، ژن‌های هدف و مسیرهای مرتبط را در طی برهمکنش *G. hirsutum-V. dahliae* شناسایی کردند که ممکن است نقش‌های مهمی در تعیین پاسخ‌های حساسیت و مقاومت گیاه میزبان در برابر بیمارگر قارچی داشته باشند و در ایجاد ارقام مقاوم به بیمارگر در برنامه‌های به‌نژادی و مهندسی ژنتیک نقش مهمی ایفا کنند.

استناد: طهماسبی، امین‌اله؛ قدوم پاریزی‌پور، محمد حامد؛ شهریاری، امیرغفار. (۱۴۰۳). بررسی بیوانفورماتیکی میکرو آر.ان.ای‌ها و ژن‌های هدف مرتبط با مقاومت و حساسیت پنبه (*Gossypium hirsutum*) به بیمارگر *Verticillium dahliae*. مجله پژوهش‌های پنبه / ایران، ۱۲ (۲)، ۱-۱۴.

DOI: 10.22092/ijcr.2024.367070.1225



© نویسندگان.

ناشر: موسسه تحقیقات پنبه کشور

مقدمه

پنبه (*Gossypium hirsutum* L.)، گیاه مهم و اقتصادی دو لپه‌ای از خانواده Malvaceae می‌باشد (کانستبل و بانگه، ۲۰۱۵). پنبه از محصولات مهم و استراتژیک کشاورزی در دنیا محسوب می‌شود که نقش بسزایی در اقتصاد و صنعت ایفا می‌نماید. این محصول با ارزش افزوده بالا از لحاظ تأمین الیاف در صنعت نساجی و میزان تولید روغن حائز اهمیت می‌باشد (عالیشاه، ۲۰۱۳). همچنین قسمت‌های مختلف این گیاه نظیر بذر، الیاف و ساقه پنبه به میزان زیادی در فراورده‌های خوراکی و کاغذسازی مورد استفاده قرار می‌گیرند (خان و همکاران، ۲۰۲۰).

گیاه پنبه همانند سایر محصولات کشاورزی همواره مورد حمله تعداد زیادی از بیمارگرهای گیاهی قرار می‌گیرد که کمیت و کیفیت محصول را به طور قابل توجهی کاهش می‌دهند. تاکنون بیش از ۴۰ نوع بیماری گیاهی در پنبه شناسایی شده است که شامل بیمارگرهایی نظیر باکتری‌ها، قارچ‌ها، نماتدها، ویروس‌ها و مالیکیوت‌ها است (چوهان و همکاران، ۲۰۲۰). قارچ خاکزی *Verticillium dahliae* باعث بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی در پنبه می‌شود که از مخرب‌ترین بیماری‌های قارچی در مناطق تولید پنبه در سراسر دنیا می‌باشد (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۸). پژمردگی ورتیسیلیومی از عوامل محدودکننده کاشت ارقام پرمحصول و حساس پنبه به این بیماری می‌باشد و باعث کاهش میزان محصول پنبه و تضعیف کیفیت الیاف و نخ در گیاهان آلوده می‌گردد. بقا عامل بیماری صورت میکرواسکلروت برای مدت طولانی در خاک می‌باشد و روی طیف وسیعی از گیاهان، ایجاد خسارت می‌کند (لوپز اسکوادرو و بلانکو لوپز، ۲۰۰۵). گیاهان آلوده علائمی نظیر سوختگی برگ‌ها، زردی و تغییر رنگ آوندی نشان می‌دهند (پاپولماتاس و همکاران، ۱۹۹۲).

با توجه به خاکزی بودن قارچ *V. dahliae*، قارچکش‌ها قادر به اثر اختصاصی روی این بیمارگر نیستند (دایف، ۲۰۱۵). ترکیبات شیمیایی با دامنه فعالیت وسیع برای کاهش زادمایه‌های ورتیسیلیوم از

طریق تدخین خاک مورد استفاده قرار می‌گیرند (پاولسون و روو، ۱۹۹۳). استفاده از ترکیبات شیمیایی مشکلاتی نظیر هزینه بالا، اثرات منفی روی موجودات زنده مفید خاک، اثرات مخرب روی سلامتی انسان و محیط زیست و ایجاد مقاومت بیمارگر به این ترکیبات را باعث می‌شود (دایف، ۲۰۱۵). کاراترین و مقرون به صرفه‌ترین روش کنترل بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی، استفاده از ارقام مقاوم پنبه می‌باشد (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۲).

در نتیجه در جهت کنترل این بیماری، استفاده از روش‌های بر پایه مهندسی ژنتیک و مقاومت به بیمارگر حائز اهمیت می‌باشد. خاموشی پس از بیان ژن، مکانیسم تنظیمی برای بازدارندگی آر.ان.ای محسوب می‌شود که توسط آر.ان.ای‌های مداخله‌کننده کوچک (small interfering RNA; siRNA) و miRNA انجام می‌شود (کیم و همکاران، ۲۰۱۹). در این میان، miRNA ها به عنوان تنظیم‌کننده‌های مهم بیان ژن‌های دخیل در فرایندهای زیستی گیاه نظیر نمو، انتقال سیگنال، تنش‌های محیطی و برهمکنش‌های بیمارگر-میزبان محسوب می‌شوند که می‌توانند برای ایجاد مقاومت به بیماری و اصلاح مولکولی مورد استفاده قرار گیرند (ژانگ و همکاران، ۲۰۲۳). miRNA ها توالی‌های کوتاه آر.ان.ای غیر کد کننده و تنظیمی با طول ۲۱-۲۴ نوکلئوتید هستند (وینت، ۲۰۰۹). تنظیم بیان ژن‌ها توسط miRNA ها از طریق تجزیه آر.ان.ای یا بازدارندگی ترجمه در سطح بعد از رونویسی رخ می‌دهد. miRNA ها در تنظیم ژن‌های مرتبط با مقاومت به بیماری و مسیرهای دفاعی گیاه نقش مهمی ایفا می‌کنند (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۹). با توجه به اهمیت miRNA ها در ایجاد مقاومت به بیماری، شناسایی ژن‌های هدف و مسیرهای مرتبط و عملکرد مولکولی miRNA های دخیل در مکانیسم مقاومت به بیماری می‌تواند در اصلاح مولکولی مقاومت به بیماری مؤثر واقع شود. همچنین دستکاری miRNA ها می‌تواند در توسعه استراتژی‌های جدید برای افزایش مقاومت به بیمارگرها مورد استفاده قرار گیرد.

بنابراین جهت توسعه ارقام پنبه مقاوم به قارچ *V. dahliae* و نیز افزایش راندمان تولید در واحد سطح، مطالعه شناسایی تنظیم کننده‌ها و مکانیسم‌های تنظیمی، ژن‌های هدف miRNA ها و مسیرهای مرتبط با مقاومت گیاه از اهمیت بالایی برخوردار است. در همین راستا، در این پژوهش انواع miRNA های مؤثر در پاسخ‌های حساسیت و مقاومت به قارچ *V. dahliae* در گیاه پنبه که در سایر مطالعات شناسایی شده بودند تعیین گردیدند و ژن‌های هدف آن‌ها و مسیرهای دخیل در پاسخ‌های حساسیت و مقاومت پنبه به بیمارگر *V. dahliae* توسط روش‌های بیوانفورماتیکی شناسایی گردیدند و ارتباط مسیرهای عملکردی آنها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای تعیین miRNA های دخیل در پاسخ‌های حساسیت و مقاومت گیاه پنبه (*G. hirsutum*) به قارچ *V. dahliae*، با مرور منابع و جمع‌آوری اطلاعات، miRNA هایی که نقش آن‌ها به اثبات رسیده بود انتخاب شدند. بر این اساس، miRNA های miR164، miR166، miR159، miR530 و miR477 با عملکرد مقاومت و miRNA های miR171a، miR482b، miR398b و miR397 با عملکرد حساسیت در گیاه پنبه در پاسخ به *V. dahliae* انتخاب شدند. توالی، عملکرد و مکانیسم اثر این miRNA ها از طریق منابع بدست آمد (جدول ۱ و ۲). شناسایی ژن‌های هدف miRNA های انتخاب شده و نحوه بازدارندگی آن‌ها از طریق psRNATarget (https://www.zhaolab.org/psRNATarget/analysis) انجام گردید و برای هر کدام از miRNA ها، شماره ژن‌های (Target Acc.) هدف تعیین گردید.

جدول ۱- اسامی miRNA های انتخابی در مقاومت گیاه پنبه (*Gossypium hirsutum*) در برابر قارچ *Verticillium dahliae*

منبع	مکانیسم اثر	عملکرد	توالی (3' → 5')	miRNA
(هو و همکاران، ۲۰۱۸)	تنظیم بعد از رونویسی فاکتور رونویسی NAC	دفاع گیاه	UGGAGAAGCAGGGCACGUGCA	miR164
(ژانگ و همکاران، ۲۰۱۶)	خاموشی ژن‌های پرآزاری قارچ (سیستئین پروتئاز وابسته به یون کلسیم و ایزوتریکودرمین هیدروکسیلاز)	دفاع گیاه	UCGGACCAGGCUCAUUC	miR166
(ژانگ و همکاران، ۲۰۱۶)	خاموشی ژن‌های پرآزاری قارچ (سیستئین پروتئاز وابسته به یون کلسیم و ایزوتریکودرمین هیدروکسیلاز)	دفاع گیاه	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA	miR159
(هو و همکاران، ۲۰۲۳)	القای پاسخ مقاومت اکتسابی سیستمیک و تنظیم سیگنال‌دهی سالیسیلیک اسید	دفاع گیاه	UGCAUUUGCACCUGCACCUUA	miR530
(هو و همکاران، ۲۰۲۰)	تنظیم بعد از رونویسی <i>GhCBP60A</i> و تنظیم بیان <i>GhICS1</i> برای بیوسنتز سالیسیلیک اسید	دفاع گیاه	ACUCUCCCUCAAGGGCUUCUG	miR477

تعداد ژن‌های هدف اختصاصی و مشترک در پاسخ‌های حساسیت و مقاومت گیاه پنبه (*G. hirsutum*) به قارچ *V. dahliae* از طریق سایت <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Ve>

nn/ مشخص گردیدند. سپس اسم و توصیف عملکرد ژن‌های هدف از گزینه Feature و Gene Features در سایت (<https://cottonfgd.net/analyze/>) تعیین

گردید. به منظور شناسایی هستی شناسی ژن های هدف و طبقه بندی فرآیند زیستی، اجزای سلولی و عملکرد مولکولی پروتئین های هدف از سایت <http://bioinformatics.sdstate.edu/go/> استفاده گردید. در بررسی برهمکنش پروتئین- پروتئین و رسم شبکه ژنی بیشترین تعداد پروتئین های هدف به عنوان کلیدی ترین ژن های هدف در پاسخ های حساسیت و مقاومت گیاه پنبه انتخاب گردیدند و سپس با استفاده از STRING (<https://string-db.org>) با پارامترهای پیش فرض آنالیز انجام شد.

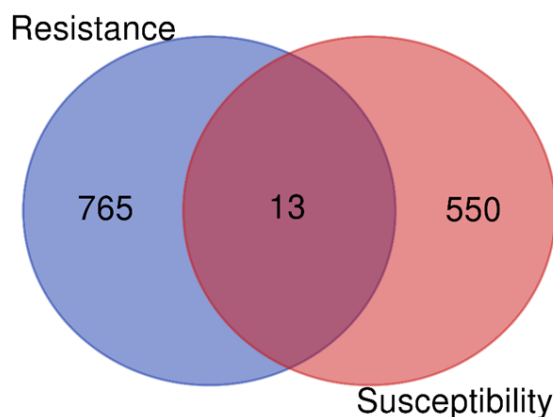
جدول ۲- اسامی miRNA های انتخابی در حساسیت گیاه پنبه (*Gossypium hirsutum*) در برابر قارچ *Verticillium dahliae*

miRNA	توالی (5' → 3')	عملکرد	مکانیسم اثر	منبع
miR171a	UGAUUGAGCCGUGCCAAUAUC	حساسیت گیاه	تنظیم بیان <i>GhPR1</i>	(هو و همکاران، ۲۰۲۳)
miR482b	UCUUGCCUACUCCACCCAUGCC	حساسیت گیاه	کاهش میزان بیان ژن های <i>PR1</i> و <i>PR2</i> سرکوب ژن های <i>CC-NBS-LRR</i>	(هو و همکاران، ۲۰۲۳)
miR398b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	حساسیت گیاه	از طریق بازدارندگی ترجمه، تداخل با پاسخ های دفاعی، تنظیم انواع اکسیژن فعال و هومئوستازی پردازش بعد از رونویسی	(میائو و همکاران، ۲۰۲۲)
miR397	AUUGAGUGCAGCGUUGAUGAA	حساسیت گیاه	<i>GhLAC4</i> ، که به طور منفی روی بیوسنتز لیگنین القا شده توسط دفاع گیاه تأثیری گذارد	(وی و همکاران، ۲۰۲۱)

انتخاب شده در پاسخ های مقاومت و حساسیت گیاه در برابر *V. dahliae* قرار می گیرند (شکل ۱). همچنین، در مجموع ۱۳ ژن مشترک تحت تأثیر miRNA ها بین مقاومت و حساسیت پنبه در پاسخ به آلودگی *V. dahliae* شناسایی شدند (شکل ۱).

نتایج و بحث

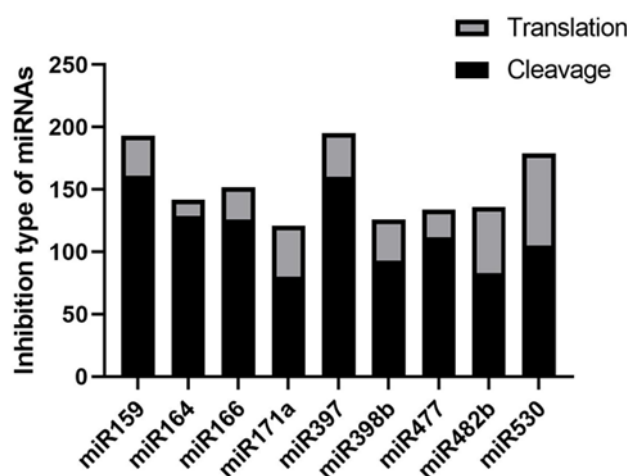
پس از انتخاب miRNA های دخیل در پاسخ های حساسیت و مقاومت گیاه پنبه (*G. hirsutum*) به قارچ *V. dahliae*، ژن های هدف و عملکرد آنها تعیین گردید. نتایج نشان داد که تعداد ۷۷۸ و ۵۶۳ ژن در پنبه به طور اختصاصی تحت تأثیر miRNA های



شکل ۱- دیاگرام Venn ژن های هدف پنبه مرتبط با miRNA های دخیل در پاسخ های مقاومت و حساسیت گیاه پنبه در برابر *V. Dahlia*

عمدتاً توسط تجزیه آر.ان.ای‌های هدف کنترل می‌شود (شکل ۲).

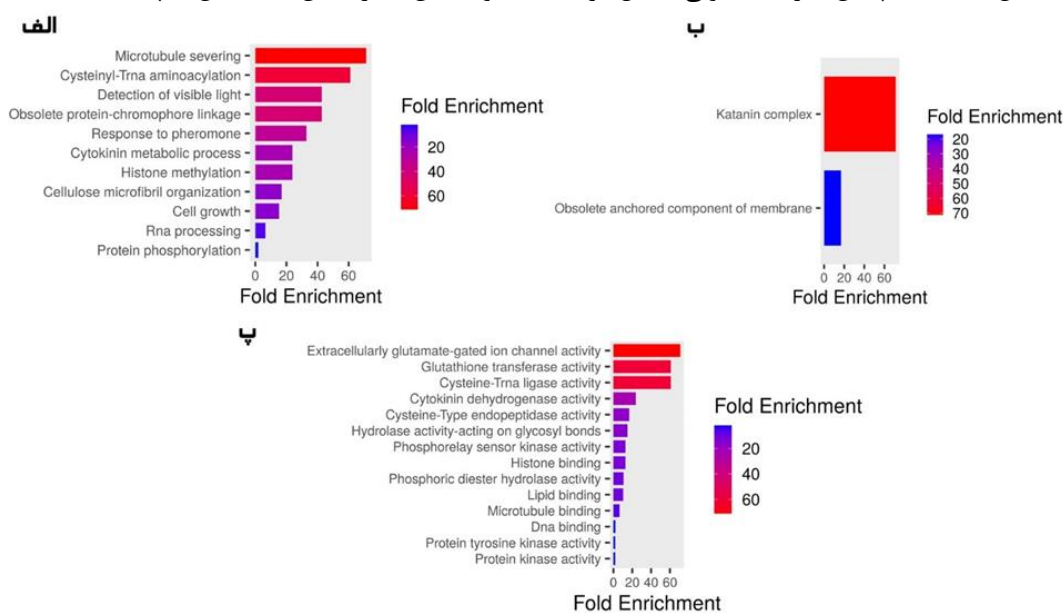
مکانیسم بازدارندگی (تجزیه آر.ان.ای/ بازدارندگی ترجمه) مرتبط با miRNA ها نشان داد که بیان ژن



شکل ۲- مکانیسم بازدارندگی (تجزیه آر.ان.ای/ بازدارندگی ترجمه) مرتبط با miRNAهای دخیل در پاسخ‌های مقاومت و حساسیت گیاه پنبه در برابر *V. dahliae*

پاسخ‌های مقاومت با کمپلکس katanin و اجزای غشا مرتبط بود (شکل ۳ ب). عملکرد مولکولی پاسخ‌های مقاومت، فعالیت‌های گلوکوتایون ترانسفراز، cysteine-tRNA لیگاز، سیتوکینین دهیدروژناز و پروتئین کیناز و قابلیت باند شونده به هیستون، لیپید، میکروتوبول و دی ان ای را نشان داد (شکل ۳-پ).

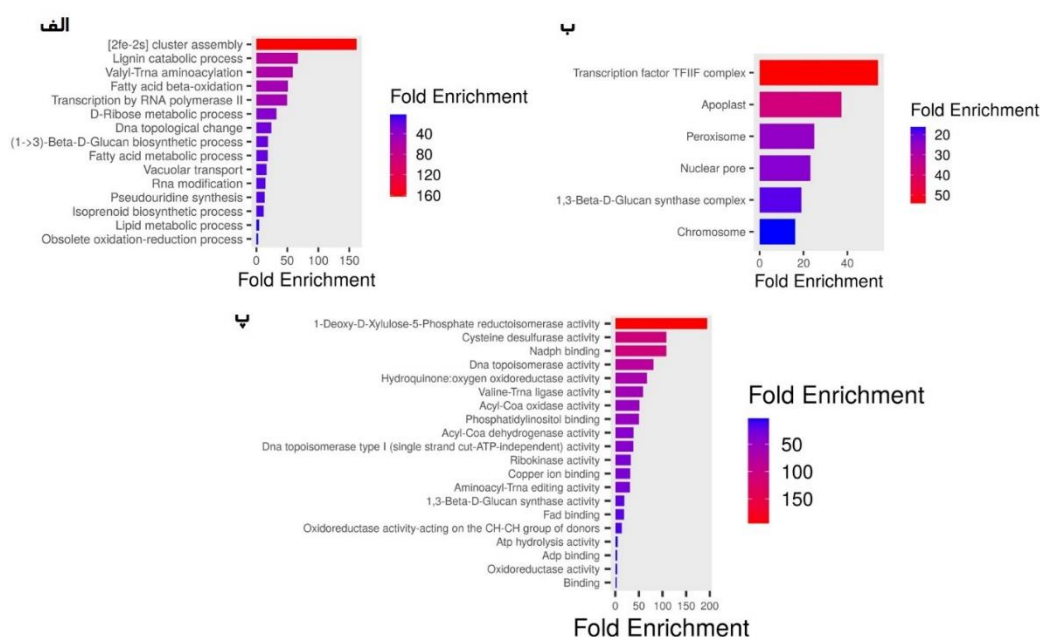
فرایند زیستی ژن‌های هدف پنبه در پاسخ‌های مقاومت با مسیرهای برش میکروتوبول، اتصال سیستئین به cysteinyl-tRNA، فرایند متابولیک سیتوکینین، متیله شدن هیستون، رشد سلول، پردازش آر.ان.ای و فسفوریله شدن پروتئین در ارتباط بود (شکل ۳ الف). همچنین اجزای سلولی دخیل در



شکل ۳- فرایند زیستی، اجزای سلولی و عملکرد مولکولی ژن‌های هدف پنبه در پاسخ‌های مقاومت گیاه پنبه در برابر *V. dahliae*

مرتبط بود (شکل ۴ ب). همچنین عملکرد مولکولی پاسخ های حساسیت، فعالیت دئوکسی زایلوز فسفات ردوکتاز ایزومراز، سیستین دی سولفوراز، دی ان ای توپوایزومراز، هیدروکینون: اکسیژن اکسیدو ردوکتاز، valine-tRNA لیگاز، acyl-co اکسیداز و دهیدروژناز، ریبو کیناز، ویرایش aminoacyl-tRNA، بتاگلوکان سنتاز، هیدرولیز ATP و اکسیدو ردوکتاز و قابلیت باند شونگی به NADPH، فسفاتیدیل اینوزیتول، یون مس، فلاوین آدنین دی نوکلئوتید و آنوزین دی فسفات را نشان داد (شکل ۴ پ).

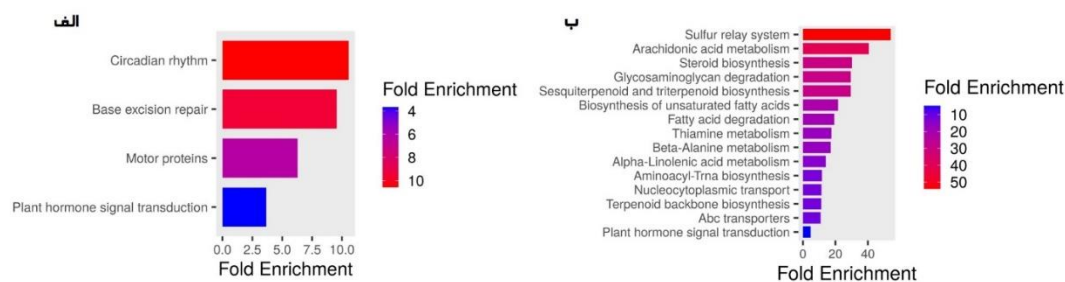
فرایند زیستی در پاسخ های حساسیت شامل مونتاژ خوشه گوگرد-آهن، فرایند کاتابولیک لیگنین، آمینواسیله شدن valyl-tRNA، اکسیده شدن اسید چرب، رونویسی، فرایند متابولیک ریبوز، اسید چرب و چربی، تغییر توپولوژی دی ان ای، فرایند بیوسنتز بتاگلوکان، انتقال آوندی، تغییر آر.ان.ای، سنتز سودوپوریدین و فرایند بیوسنتز ایزوپرنوئید بود (شکل ۴ الف). اجزای سلولی دخیل در پاسخ های حساسیت با کمپلکس فاکتور رونویسی، آپوپلاست، پراکسی زوم، منفذ هسته ای، کمپلکس بتاگلوکان سنتاز و کروموزم



شکل ۴- فرایند زیستی، اجزای سلولی و عملکرد مولکولی ژن های هدف پنبه در پ اسخ های حساسیت گیاه پنبه در برابر *V. dahliae*

اشباع"، "تجزیه اسید چرب"، "متابولیسم تیامین، بتا آلانین و آلفا لینولنیک اسید"، "بیوسنتز aminoacyl-tRNA"، "انتقال اجزای سلولی بین هسته و سیتوپلاسم"، "بیوسنتز ترپنوئید"، "انتقال دهنده های کاست اتصال ATP" و "انتقال سیگنال هورمون گیاهی" در پاسخ حساسیت پنبه به *V. dahliae* ضروری بود (شکل ۵ ب).

با توجه به تجزیه و تحلیل KEGG، مسیرهای "چرخه شبانه روزی"، "ترمیم برش باز"، "پروتئین های حرکتی" و "انتقال سیگنال هورمون گیاهی" در مسیر مقاومت پنبه از اهمیت زیادی برخوردار بودند (شکل ۵ الف) و مسیرهای "سیستم رله گوگرد"، "متابولیسم آراشیدونیک اسید"، "بیوسنتز استروئیدی"، "تجزیه گلیکوز آمینوگلیکان"، و "بیوسنتز تری ترپنوئید و سزکویی ترپنوئید"، "بیوسنتز اسیدهای چرب غیر

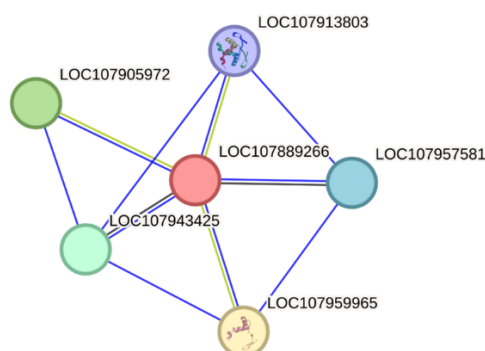


شکل ۵- آنالیز KEGG ژن‌های هدف پنبه در پاسخ‌های مقاومت و حساسیت گیاه پنبه در برابر *V. dahliae*

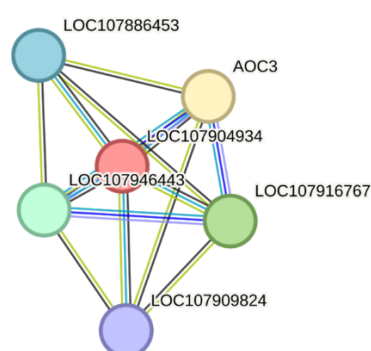
را کاهش داد. همچنین GhMYB4 قادر به اتصال به پروموتور تعداد زیادی ژن نظیر *GhC4H-1*، *GhC4H-2*، *Gh4CL-4* و *GhCAD-3* در سنتز لیگنین می‌باشد که منجر به بازدارندگی در بیان آن‌ها می‌شود. کاهش میزان لیگنین در گیاهان پنبه با بیان بالای GhMYB4 منجر به تغییرات در استحکام دیواره سلولی گیاه شد و اولیگوگالاکتورونیدهای بیشتری را آزاد کرد که می‌تواند باعث تحریک پاسخ‌های دفاعی گیاه شود. به طور مشابهی، کاربرد خارجی پلی گالاکتورونیک اسید در پنبه باعث فعال شدن مسیر دفاعی بر پایه بیوسنتز هورمون‌های جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید در برابر *V. dahliae* شد (ژیائو و همکاران، ۲۰۲۱). آلن اکسید سنتاز باعث کاتالیز مرحله اول بیوسنتز جاسمونیک اسید از هیدروپراکسید اسیدهای چرب آزاد می‌شود (سیواسانکار و همکاران، ۲۰۰۰). همچنین مطالعات اخیر بر نقش آلن اکسید سنتاز در دفاع گیاه علیه بیمارگرها تاکید دارد (سرازینا و همکاران، ۲۰۲۱). آلن اکسید سنتاز قادر به برهمکنش با دو آنزیم آلن اکسید سیکلاز و لیپواکسیژناز دخیل در مسیر اکسی لیپین می‌باشد که منجر به افزایش تولید جاسمونیک اسید می‌شود (پلمن و همکاران، ۲۰۱۹). جاسمونیک اسید به عنوان مولکول سیگنال در دفاع گیاه می‌تواند باعث تقویت سیستم ایمنی گیاه از طریق مقاومت القایی و اکتسابی سیستمیک شود (رویکودهری و همکاران، ۲۰۲۴).

این نتایج، miRNA های دخیل در مقاومت و حساسیت پنبه، ژن‌های هدف و مسیرهای مرتبط را در طی برهمکنش *G. hirsutum-V. dahliae* شناسایی کردند که ممکن است نقش‌های مهمی در تعیین پاسخ‌های حساسیت و مقاومت گیاه میزبان در برابر بیمارگر قارچی داشته باشند و در تولید ارقام مقاوم به بیمارگر در برنامه‌های بهنجادی و مهندسی ژنتیک نقش مهمی ایفا کنند. بیشترین تعداد ژن‌های هدف در برابر همه miRNA های دخیل در پاسخ‌های مقاومت گیاه پنبه به ترتیب مربوط به فاکتور رونویسی GAMYB و آلن اکسید سنتاز با تعداد ۱۴ و ۸ بود. فاکتور رونویسی GAMYB با فاکتور رونویسی TCP2 و پروتئین شبه At1g75720 خانواده WEB و همچنین آلن اکسید سنتاز با پروتئین‌های آلن اکسید سیکلاز و لیپواکسیژناز بیشترین برهمکنش را نشان داد (شکل ۶). نتایج مطالعه اخیر نشان داد که فاکتور رونویسی MYB4 در پنبه به عنوان تنظیم کننده منفی در بیوسنتز لیگنین عمل می‌کند که منجر به تغییر در استحکام دیواره سلولی و فعال شدن پاسخ دفاعی گیاه می‌شود. لیگنینی شدن القا شده توسط دفاع در گیاهان برای ایمنی ذاتی ضروری می‌باشد و همبستگی بین افزایش لیگنینی شدن و مقاومت به بیماری گزارش شده است (ژیائو و همکاران، ۲۰۲۱). افزایش بیان GhMYB4 در پنبه و آرابیدوپسیس باعث افزایش مقاومت گیاهان نسبت به *V. dahliae* شد، در حالی که میزان لیگنین

فاکتور رونویسی GAMYB

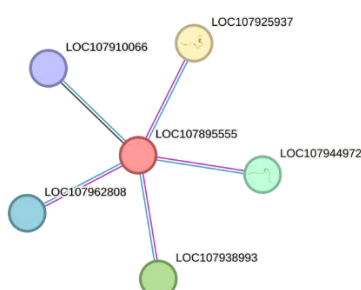


آلن اکسید سنتاز

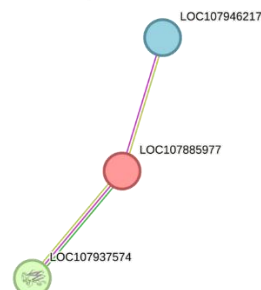


شکل ۶- برهمکنش پروتئین- پروتئین و رسم شبکه ژنی بیشترین تعداد پروتئین‌های هدف در پاسخ‌های مقاومت گیاه پنبه در برابر *V. dahlia*

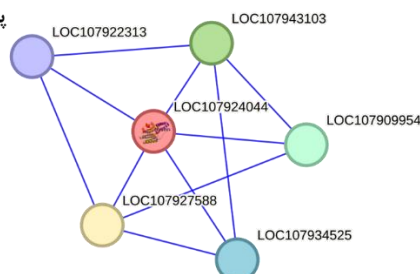
پروتئین مقاومت به بیماری At4g27190



لاکاز



پروتئین ۶ شبه scarecrow



شکل ۷- برهمکنش پروتئین- پروتئین و رسم شبکه ژنی بیشترین تعداد پروتئین‌های هدف در پاسخ‌های مقاومت گیاه پنبه در برابر *V. dahlia*

پنتاسیستین ۲ بیشترین میزان برهمکنش را نشان داد (شکل ۷). نتایج مطالعه اخیر نشان داد که اختلال در لاکاز ۴ و ۱۷ باعث کاهش میزان لیگنین در ساقه گیاه آرابیدوپسیس می‌شود که بیانگر نقش لاکاز ۴ و ۱۷ در لیگنینی شدن ساقه‌های آرابیدوپسیس بود (برقت و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین لاکاز نقش مهمی در مقاومت پنبه در برابر *V. dahliae* از طریق رسوب لیگنین ایفا کرد (وو و همکاران، ۲۰۱۴). ژن بیوسنتز لیگنین در پنبه (*GhLAC4*) با نقش در مقاومت گیاه

بیشترین تعداد ژن‌های هدف در برابر همه miRNAهای دخیل در پاسخ‌های حساسیت گیاه پنبه به ترتیب مربوط به پروتئین مقاومت به بیماری At4g27190، لاکاز ۱۷، پروتئین ۶ شبه scarecrow و لاکاز ۴ با تعداد ۱۸، ۱۴، ۱۰ و ۱۰ بود. پروتئین مقاومت به بیماری At4g27190 با پروتئین شبه ۴ برهمکنش کننده با RPM1، پروتئین لاکاز با پلاستوسیانین و پروتئین TATC ترانسلوکاز مستقل از sec و پروتئین ۶ شبه scarecrow با پروتئین شبه

توسط miR397 به صورت تجزیه آر.ان.ای تنظیم می‌شود که باعث ایجاد حساسیت پنبه به *V. dahliae* می‌شود. این یافته‌ها بر نقش لیگنین به عنوان لایه‌ای از پاسخ دفاعی گیاه به صورت مانع فیزیکی/شیمیایی در حفاظت دیواره سلولی گیاه در برابر تجزیه سلولاز یا ترشحات قارچی و محدود کردن رشد بیمارگر تاکید دارد (وی و همکاران، ۲۰۲۱). پیشنهاد شده است که تولید سریع و رسوب لیگنین در دیواره سلول‌های پوست و اپیدرم ریشه به عنوان مرحله اول دفاعی گیاه در برابر *V. dahliae* محسوب می‌شود که به صورت سد فیزیکی/شیمیایی برای محدود کردن رشد و کلونیزه کردن بیمارگر عمل می‌کند (پلنگا و همکاران، ۲۰۲۱).

نتیجه‌گیری

این پژوهش به منظور شناسایی ژن‌های هدف miRNA های دخیل در پاسخ‌های مقاومت و حساسیت گیاه پنبه در برابر *V. dahliae* و بررسی ارتباط مسیرهای عملکردی آنها نسبت به یکدیگر انجام شده است. ارزیابی miR164، miR166، miR159، miR530 و miR477 با عملکرد مقاومت و miR171a، miR482b، miR398b و miR397 با عملکرد حساسیت در گیاه پنبه در پاسخ به *V. dahliae* نشان داد که تعداد ۷۷۸ و ۵۶۳ ژن در پنبه به طور اختصاصی تحت تأثیر miRNA های دخیل در پاسخ‌های مقاومت و حساسیت گیاه در برابر *V. dahliae* قرار می‌گیرند. بیشترین تعداد ژن‌های هدف در برابر miRNA های

دخیل در پاسخ‌های مقاومت گیاه پنبه به ترتیب مربوط به فاکتور رونویسی GAMYB و آلن اکسید سنتاز بود. در حالی که، بیشترین تعداد ژن‌های هدف در برابر miRNA های دخیل در پاسخ‌های حساسیت گیاه پنبه به ترتیب مربوط به پروتئین مقاومت به بیماری At4g27190، لاکاز ۱۷، پروتئین ۶ شبه scarecrow و لاکاز ۴ بود. بر اساس نتایج بدست آمده، miRNA های دخیل در مقاومت و حساسیت پنبه، ژن‌های هدف و مسیرهای مرتبط در طی برهمکنش *G. hirsutum-V. dahliae* ممکن است نقش‌های مهمی در تعیین پاسخ‌های حساسیت و مقاومت گیاه میزبان در برابر بیمارگر قارچی داشته باشند و در ایجاد ارقام مقاوم به بیمارگر در برنامه‌های بهنجاری و مهندسی ژنتیک نقش مهمی ایفا کنند. شناسایی ژن‌های هدف و نقش تنظیمی miRNA ها در تنظیم بیان ژن‌های مسیرهای مقاومت و حساسیت می‌تواند در مهندسی مسیر اصلاح مقاومت به بیماری در گیاه پنبه در برابر بیمارگر قارچی *V. dahliae* مؤثر باشد و باعث افزایش درک ما از ارتباط بین مسیرهای بیوشیمیایی نظیر سنتز لیگنین، هورمون‌های دفاعی و ایمنی گیاه شود. بعضی از مسیرهای تنظیمی بر نقش بیوسنتز لیگنین و هورمون‌های جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید در مقاومت گیاه پنبه در برابر *V. dahliae* تاکید داشت که برای تأیید نتایج نیاز به مطالعات بیشتری می‌باشد. همچنین شناخت بیشتر مکانیسم انتقال میکرو آر.ان.ای گیاه پنبه به قارچ می‌تواند در مدیریت قارچ بیمارگر *V. dahliae* مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Alishah, O. 2013. Genetics and breeding of Cotton. Academic Publishing Publications, 195 p.
2. Berthet, S., Demont-Caulet, N., Pollet, B., Bidzinski, P., Cézard, L., Le Bris, P., Borrega, N., Hervé, J., Blondet, E., Balzergue, S., and Lapierre, C. 2011. Disruption of *LACCASE4* and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems. The Plant Cell, 23(3), 1124-1137.
3. Chohan, S., Perveen, R., Abid, M., Tahir, M. N., and Sajid, M. 2020. Cotton diseases and their management. Cotton Production and Uses: Agronomy, Crop Protection and Postharvest Technologies, 239-270.
4. Constable, G.A., and Bange, M.P. 2015. The yield potential of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Field Crops Research, 182, 98-106.

5. Daayf, F. 2015. Verticillium wilts in crop plants: pathogen invasion and host defence responses. Canadian Journal of Plant Pathology, 37(1):8-20. <https://doi.org/10.1080/07060661.2014.989908>.
6. Hu, G., Ge, X., Wang, P., Chen, A., Li, F., and Wu, J. 2023. The cotton miR171a-SCL6 module mediates plant resistance through regulating GhPR1 expression. Plant Physiology and Biochemistry, 202, 107995.
7. Hu, G., Hao, M., Wang, L., Liu, J., Zhang, Z., Tang, Y., Peng, Q., Yang, Z., and Wu, J. 2020. The cotton miR477-CBP60A module participates in plant defense against *Verticillium dahliae*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 33(4), 624-636.
8. Hu, G., Lei, Y., Wang, L., Liu, J., Tang, Y., Zhang, Z., Chen, A., Peng, Q., Yang, Z., and Wu, J. (2018). The ghr-miR164 and GhNAC100 module participates in cotton plant defence against *Verticillium dahliae*. BioRxiv, 440826.
9. Hu, G., B., Wang, P., Jia, P., Wu, C., Lu, Y., Xu, L., Shi, F., Zhang, Zhong, N., and Chen, A. 2023. The cotton miR530-SAP6 module activated by systemic acquired resistance mediates plant defense against *Verticillium dahliae*. Plant Science, 330, 111647.
10. Khan, M.A., Wahid, A., Ahmad, M., Tahir, M.T., Ahmed, M., Ahmad, S. and Hasanuzzaman, M. 2020. World cotton production and consumption: An overview, in cotton production Uses, eds S. Ahmad and M. Hasanuzzaman (Singapore: Springer), 1–7. DOI: 10.1007/978-981-15-1472-2_1.
11. Palanga, K.K., Liu, R., Ge, Q., Gong, J., Li, J., Lu, Q., Li, P., Yuan, Y. and Gong, W. 2021. Current advances in pathogen-plant interaction between *Verticillium dahliae* and cotton provide new insight in the disease management. Journal of Cotton Research, 4, 1-13.
12. Kim, M. H., Jeon, J., Lee, S., Lee, J. H., Gao, L., Lee, B. H., Park, J. M., Kim, Y. J., and Kwak, J. M. 2019. Proteasome subunit RPT2a promotes PTGS through repressing RNA quality control in *Arabidopsis*. Nature Plants, 5(12), 1273-1282.
13. Lopez-Scudero, F.J., and Blanco-Lopez, M.A. 2005. Isolation and morphologic characterization of Microsclerotia of *Verticillium dahliae* isolate from soils. Biotechnology, 4: 296-304.
14. Miao, Y., Chen, K., Deng, J., Zhang, L., Wang, W., Kong, J., Klosterman, S.J., Zhang, X., Aierxi, A. and Zhu, L. 2022. miR398b negatively regulates cotton immune responses to *Verticillium dahliae* via multiple targets. The Crop Journal, 10(4), 1026-1036.
15. Paplomatas, E.J., Bassett, D.M., Broome, J.C. and DeVay, J.E. 1992. Incidence of *Verticillium* wilt and yield losses of cotton cultivars (*Gossypium hirsutum*) based on soil inoculum density of *Verticillium dahliae*. Phytopathology, 82, 1417–1420.
16. Pollmann, S., Springer, A., Rustgi, S., Von Wettstein, D., Kang, C., Reinbothe, C. and Reinbothe, S. 2019. Substrate channeling in oxylipin biosynthesis through a protein complex in the plastid envelope of *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany, 70(5), 1483-1495.
17. Powelson, M.L. and Rowe, R.C. 1993. Biology and management of early dying of potatoes. Annual Review of Phytopathology, 31, 111–126.
18. Roychowdhury, R., Hada, A., Biswas, S., Mishra, S., Prusty, M.R., Das, S.P., Ray, S., Kumar, A. and Sarker, U. 2024. Jasmonic Acid (JA) in plant immune response: unravelling complex molecular mechanisms and networking of defence signalling against pathogens. Journal of Plant Growth Regulation, 1-26.
19. Serrazina, S., Machado, H., Costa, R.L., Duque, P. and Malhó, R. 2021. Expression of *Castanea crenata* allene oxide synthase in *Arabidopsis* improves the defense to *Phytophthora cinnamomi*. Frontiers in Plant Science, 12, 628697.
20. Sivasankar, S., Sheldrick, B. and Rothstein, S.J. 2000. Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. Plant Physiology, 122(4), 1335-1342.
21. Voinnet, O. 2009. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. Cell, 136, 669–687. doi:10.1016/j.cell.2009.01.046.

22. Wei, T., Tang, Y., Jia, P., Zeng, Y., Wang, B., Wu, P., Quan, Y., Chen, A., Li, Y. and Wu, J. 2021. A cotton lignin biosynthesis gene, GhLAC4, fine-tuned by ghr-miR397 modulates plant resistance against *Verticillium dahliae*. *Frontiers in Plant Science*, 12, 743795.
23. Wu, P., Lu, C., Wang, B., Zhang, F., Shi, L., Xu, Y., Chen, A., Si, H., Su, J. and Wu, J. 2023. Cotton RSG2 mediates plant resistance against *Verticillium dahliae* by miR482b regulation. *Biology*, 12(7), 898.
24. Wu, L.Z., Wang, X.F., Zhang, Y., Li, X., Zhang, G., Wu, L., Li, Z., and Ma, Z. 2014. Function of acid insoluble lignin and GhLaccase in cotton resistance to *Verticillium* wilt. *Acta Agronomica Sinica*, 40(7), 1157– 63. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1006.2014.01157>.
25. Xiao, S., Hu, Q., Shen, J., Liu, S., Yang, Z., Chen, K., Klosterman, S.J., Javornik, B., Zhang, X. and Zhu, L. 2021. GhMYB4 downregulates lignin biosynthesis and enhances cotton resistance to *Verticillium dahliae*. *Plant Cell Reports*, 40, 735-751.
26. Zhang, J., Sanogo, S., Flynn, R., Baral, J.B., Bajaj, S., Hughs, S.E. and Percy, R.G. 2012. Germplasm evaluation and transfer of *Verticillium* wilt resistance from Pima (*Gossypium barbadense*) to Upland cotton (*G. hirsutum*). *Euphytica*. 187(2), 147–160.
27. Zhang, L., Wang, M., Li, N., Wang, H., Qiu, P., Pei, L., Xu, Z., Wang, T., Gao, E., Liu, J. and Liu, S. 2018. Long noncoding RNA s involve in resistance to *Verticillium dahliae*, a fungal disease in cotton. *Plant Biotechnology Journal*, 16(6), 1172-1185.
28. Zhang, T., Zhao, Y.L., Zhao, J.H., Wang, S., Jin, Y., Chen, Z.Q., Fang, Y.Y., Hua, C.L., Ding, S.W. and Guo, H.S. 2016. Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nature Plants*, 2(10), 1-6.29.
29. Zhang, R., Zheng, F., Wei, S., Zhang, S., Li, G., Cao, P. and Zhao, S. 2019. Evolution of disease defense genes and their regulators in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 335.