



ISSN: 2676-7309



Lorestan University

Genomic Analysis of the Sesame *WOX* Gene Family and Expression Patterns of the Selected Genes Under Drought Stress

Mehdi Sabouri | Rasool Asghari Zakaria* | Nasser Zare | Sakineh Padyab

Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

*Corresponding author ✉: r-asghari@uma.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:

Received: October 29, 2025;
Received in revised form: December 10, 2025;
Accepted: December 23, 2025;
Available online: December 30, 2025

Keywords:

Gene expression,
Drought stress,
WOX gene family,
Sesame,
qRT-PCR

ABSTRACT

In this study, the *WOX* gene family in sesame (*Sesamum indicum* L.) was comprehensively analyzed. A total of 36 *SiWOX* genes were identified in the sesame genome, distributed asymmetrically across the chromosomes, with the highest density observed on linkage groups (chromosomes) 1 and 2. The physicochemical characterization revealed that the *WOX* proteins ranged in length from 175 to 853 amino acids, with molecular weights between 20.11 and 93.62 kDa, and aliphatic indices ranging from 50 to 92.55. The isoelectric point (pI) values varied between 4.99 and 9.56, while the negative GRAVY values indicated the hydrophilic nature of the proteins. Subcellular localization prediction suggested that most proteins were localized in the nucleus, although some were also found in the chloroplast, cytoplasm, mitochondria, and plasma membrane. Phylogenetic analysis of *SiWOX* and *AtWOX* genes classified them into four main groups. Promoter analysis revealed 61 cis-regulatory elements associated with light, hormone, and stress-responsive pathways. Gene structure analysis showed variation in the number of exons and introns, and the presence of a conserved homeodomain in all proteins confirmed their role in DNA binding. Expression profiling of *SiWOX9*, *SiWOX16*, and *SiWOX36* in two genotypes, Sardari and Dashtestan, showed that Sardari exhibited a more stress response, particularly through the significant upregulation of *SiWOX16* after 48 hours. In contrast, the expression of these genes in Dashtestan was reduced or fluctuated slightly. Further RNA sequencing research is needed to identify candidate genes for breeding stress-tolerant cultivars and to support future functional studies and genome-assisted breeding.



Cite this article: Sabouri, M., Asghari Zakaria, R., Zare, N. and Padyab, S. (2025). Genomic analysis of the sesame *WOX* gene family and expression patterns of the selected genes under drought stress. *Plant Genetic Research*, 12(2): 1–22.

DOI: <https://doi.org/10.22034/pgr.2025.2077126.1024>



© Author(s) retain the copyright.

Homepage: <https://www.pgr.lu.ac.ir> | Publisher: Lorestan University

Introduction

Homeobox (HB) proteins, including the *WOX* family, are transcription factors crucial for eukaryotic growth and morphogenesis. In sesame (*Sesamum indicum* L.), an economically and nutritionally important oilseed crop cultivated in drought-prone regions, drought stress significantly limits yield. Given the availability of the sesame genome and the demand for vegetable oils, identifying *WOX* genes and understanding their expression patterns under drought stress is vital for improving drought tolerance. This study aimed to identify sesame *WOX* genes, conducting phylogenetic analysis, and examining their expression in aerial organs under drought conditions to identify candidate genes to enhance drought tolerance.

Materials and Methods

To identify sesame *WOX* gene family members, Arabidopsis *WOX* protein sequences were used as queries in a tBLASTn search against the sesame genome database in NCBI. Redundant and unrelated sequences were removed after initial analysis. The SMART server was used to confirm the presence of the *WOX* domain in the identified sequences. ProtParam was used to calculate protein length, molecular weight, isoelectric point, instability index, hydrophobicity, and other physicochemical properties. Subcellular localization was predicted using WOLF PSORT software. Evolutionary relationships were analyzed by aligning sesame and Arabidopsis *WOX* protein sequences using ClustalW and constructing a Maximum Likelihood phylogenetic tree in MEGA7 with 1000 bootstrap replicates. Cis-regulatory elements associated with hormones and stresses were identified in approximately 2000 bp of promoter sequences, and their distribution was visualized. Exon-intron architecture were investigated using genomic DNA and coding sequences (CDS). Conserved domains in protein sequences were graphically presented as sequence logos to show amino acid frequency and conservation patterns in SiWOX proteins. To investigate *WOX* gene expression under drought stress, sesame seeds from Sardari and Dashtestan genotypes were grown hydroponically under a 16/8 hour light/dark rhythm. Two-week-old seedlings were treated with PEG 6000 solution (-3 bar osmotic pressure), and leaf samples were collected at 0, 12, 24, and 48 hours post treatment, then immediately frozen in liquid nitrogen. Total RNA was extracted, genomic DNA was removed, and cDNA was synthesized. qRT-PCR analysis was performed with selected candidate genes specific primers and *18S rRNA* as the reference gene, with three technical and three biological replicates. Gene expression levels were quantified using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, and significant changes were determined at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ levels.

Results and Discussion

A comprehensive analysis of the *WOX* gene family in sesame identified 36 *SiWOX* genes, a number exceeding that found in *Arabidopsis thaliana* (15), rice (13), and maize (21), likely due to gene duplication events. These genes are unevenly distributed across sesame chromosomes, with linkage groups (chromosomes) 1 and 2 exhibiting the highest density. Physicochemical analysis revealed that SiWOX proteins ranged from 175 to 853 amino acids, with molecular weights between 20.11 and 93.62 kDa and aliphatic indices from 50 to 92.55, suggesting high stability. Isoelectric points ranged from 4.99 to 9.56, and consistently negative GRAVY values indicated their hydrophilic nature. Subcellular localization studies showed that most SiWOX proteins reside in the nucleus, consistent with their role as transcription factors, while others are located in the chloroplast, mitochondria, cytoplasm, and plasma membrane, suggesting diverse functions. Phylogenetic analysis grouped *SiWOX* and *AtWOX* genes into four well-supported clades, indicating a shared evolutionary history and facilitating functional prediction. Promoter analysis identified 61 types of cis-regulatory elements, including core (TATA-box, CAAT-box), light-responsive (G-box, GT1-motif), hormone-responsive (ABRE, TGA-element, TCA-element), and stress-responsive (MBS, LTR, TC-rich repeats) elements, reflecting complex *WOX* gene regulation. Gene structure analysis revealed variations in exon-intron number, categorized as simple (2–3 exons), moderate (4–6 exons),

and complex (18–19 exons), potentially reflecting functional specialization. Domain analysis confirmed the presence of Homeodomain and Homeodomain superfamily domains in all SiWOX proteins, crucial for DNA binding. Additionally, HALZ domains were detected in SiWOX02, SiWOX12, SiWOX17, and SiWOX26, possibly contributing to stability and protein-protein interactions. bZIP_2 and HD-ZIP_N domains, associated with hormonal and stress responses, were found in SiWOX10, SiWOX14, and SiWOX16. Sequence logo analysis highlighted the conservation of amino acids R, K, W, and L in specific regions, underscoring their importance in DNA-binding. Expression analysis of the *SiWOX9*, *SiWOX16*, and *SiWOX36* genes in Sardari and Dashtestan genotypes revealed distinct stress responses. In Sardari, *SiWOX16* expression was significantly increased over 22-fold after 48 hours of drought stress treatment, whereas *SiWOX9* and *SiWOX36* showed a gradual up-regulation. Conversely, Dashtestan exhibited decreased or slightly fluctuating gene expression; *SiWOX16* and *SiWOX36* were markedly reduced at 48 hours, with only *SiWOX9* showing a minor late-stage increase.

Conclusions

In conclusion, this study identified and characterized 36 *SiWOX* genes in *S. indicum*, revealing genomic expansion likely through gene duplication, non-random chromosomal distribution, and diverse gene structures indicative of functional specialization. Most SiWOX proteins were predicted to be stable, hydrophilic, and nucleus-localized transcription factors. Phylogenetic analysis revealed conserved clades shared with Arabidopsis, while promoter and domain analyses identified regulatory elements and motifs associated with light, hormones, stress, and protein-protein interactions. Differential expression patterns under drought stress in Sardari and Dashtestan, particularly the induction of *SiWOX16* and up-regulation of *SiWOX9* and *SiWOX36* in Sardari, suggested their possible roles in drought tolerance. However, deeper studies using RNAseq data are needed to shed light on the contribution of *WOX* gene family in drought tolerance in sesame

Author Contributions

M. Sabouri conducted the experiment. R. AsghariZakaria and N. Zare designed the experiment, supervised the research, revised and edited the final copy of the manuscript. S. Padyab analyzed the data and write the original draft of the manuscript.

Data Availability Statement

Data available on request from the authors.

Acknowledgements

We thank the Vice Chancellor for Research at the University of Mohaghegh Ardabili and the Food Security Program Office of the Defense Industries Research Educational Institute for their financial support and collaboration in this research.

Ethical Considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, and plagiarism, and any form of misconduct.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

تحلیل ژنومی خانواده ژنی *WOX* در کنجد (*Sesamum indicum* L.) و بررسی الگوی بیان برخی از ژن‌های آن تحت تنش خشکی

مهدی صبوری  | رسول اصغری زکریا*  | ناصر زارع  | سکینه پادیاب 

گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

در این پژوهش، شناسایی جامع و تحلیل خانواده ژنی *WOX* در گیاه کنجد (*Sesamum indicum* L.) انجام شد. در مجموع ۳۶ ژن *SiWOX* در ژنوم کنجد شناسایی گردیدند که به طور نامتقارن بر روی کروموزوم‌ها توزیع شده و بیشترین تراکم در گروه‌های پیوستگی (کروموزوم‌های) ۱ و ۲ مشاهده شد. بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نشان داد که طول پروتئین‌های *WOX* بین ۱۷۵ تا ۸۵۳ اسیدآمین، وزن مولکولی بین ۲۰/۱۱ تا ۹۳/۶۲ کیلو دالتون و شاخص آلیفاتیک بین ۵۰ تا ۹۲/۵۵ متغیر بود. مقادیر pI بین ۴/۹۹ تا ۹/۵۶ بوده و شاخص منفی GRAVY ماهیت آب‌دوست پروتئین‌ها را نشان داد. پیش‌بینی جایگاه سلولی بیانگر آن بود که اغلب پروتئین‌ها در هسته قرار دارند، اما برخی نیز در کلروپلاست، سیتوپلاسم، میتوکندری و غشای پلاسمایی مشاهده شدند. تحلیل فیلوژنتیکی ژن‌های *SiWOX* آن‌ها را در چهار گروه اصلی طبقه‌بندی کرد. بررسی عناصر سیس در ناحیه پروموتری، ۶۱ عنصر تنظیمی مرتبط با پاسخ‌های نوری، هورمونی و تنش‌های محیطی را آشکار نمود. نتایج تحلیل ساختار ژنی، تفاوت در تعداد اگزون‌ها و اینترون‌ها را نشان داد و وجود دمین حفاظت‌شده هومودمین در تمام پروتئین‌ها نقش آن‌ها در اتصال به DNA را تأیید کرد. تحلیل بیان ژن‌های *SiWOX9*، *SiWOX16* و *SiWOX36* در دو ژنوتیپ سرداری و دشتستان نشان داد که ژنوتیپ سرداری پاسخ بیشتری به تنش دارد؛ به‌ویژه برای ژن *SiWOX16* که افزایش چشمگیری در ۴۸ ساعت نشان داد. در مقابل، در ژنوتیپ دشتستان بیان این ژن‌ها کاهش یا نوسان خفیف داشت. با این حال، برای شناسایی ژن‌های کاندید برای بهنژادی ارقام متحمل به تنش و فراهم کردن پایه‌ای برای مطالعات عملکردی آینده و بهنژادی به کمک ابزارهای ژنومی، تحقیقات بیشتر به‌ویژه بر اساس داده‌های توالی‌یابی RNA ضروری است.

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۰۷

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۹/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۰۲

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۱۰/۰۹

واژگان کلیدی:

بیان ژن

تنش خشکی

خانواده ژنی *WOX*

کنجد

qRT-PCR

مقدمه

(2014). مطالعات نشان داده‌اند که مرحله گل‌دهی، بحرانی‌ترین مرحله رشد این گیاه در برابر خشکی است و با افزایش شدت تنش، عملکرد آن به شدت افت می‌کند (Sun et al., 2010; Hassanzadeh et al., 2009). همچنین، گزارش‌هایی به تأثیر منفی خشکی بر کیفیت و کمیت روغن کنجد اشاره کرده‌اند (Ozkan and Kulak, 2013). دانه کنجد به دلیل دارا بودن روغن گیاهی مرغوب و درصد بالای روغن (حدود ۵۵ درصد) (Oboulbiga et al., 2023)، جایگاه ویژه‌ای در میان محصولات روغنی دارد (Pathak et al., 2014). روغن این گیاه سرشار از آنتی‌اکسیدان‌هایی همچون سزامین، سزامولین و سزامول بوده و از پایداری و ماندگاری بالایی برخوردار است (Oboulbiga et al., 2023). با توجه به افزایش پیش‌بینی‌شده تقاضای جهانی برای روغن‌های گیاهی که تا سال ۲۰۵۰ به حدود ۲۴۰ میلیون تن خواهد رسید (Barcelos et al., 2015)، به‌نژادی ارقام کنجد با تحمل بیشتر به خشکی به عنوان یک هدف مهم در برنامه‌های به‌نژادی مطرح شده است (Dossa et al., 2016). در این راستا، انتشار توالی کامل ژنوم این گیاه (Wang et al., 2015) بستر ارزشمندی برای تحلیل جامع خانواده‌های ژنی فراهم کرده است. مطالعات متعددی بر روی ژن‌ها و خانواده‌های ژنی مختلف در کنجد انجام شده است که عمدتاً بر تحلیل‌های بیوشیمیایی، مورفولوژیکی و برخی خانواده‌های ژنی تحت تنش‌های محیطی تمرکز داشته‌اند (Dossa et al., 2017; Padyab et al., 2025). اما تحقیقات محدودی روی خانواده ژنی *WOX* در کنجد انجام شده و اطلاعات جامع و سیستماتیک از تعداد، ساختار، تکامل و الگوی بیان این ژن‌ها در اندام‌های مختلف و به‌ویژه تحت شرایط تنش خشکی هنوز ناقص است. با وجود اهمیت ژن‌های *WOX* در رشد، تمایز اندام‌ها و پاسخ به تنش در گیاهان مدل، بررسی دقیق این خانواده ژنی در کنجد و نقش آن‌ها در مقاومت به خشکی تاکنون انجام نشده است. با توجه به اهمیت فاکتورهای رونویسی مختلف در تنظیم بیان ژن و فعال‌سازی رونویسی ژن‌های دخیل در تحمل شرایط تنشی (Fahmideh et al., 2025; Hassanzadeh et al., 2025)، هدف از این مطالعه ارائه تصویری جامع از خانواده ژنی *WOX* در کنجد شامل شناسایی و تعیین ویژگی‌های ژن‌ها در ژنوم، تحلیل‌های فیلوژنتیکی و تکاملی و بررسی الگوی بیان آن‌ها در اندام‌های هوایی تحت

پروتئین‌های Homeobox (HB) به یک ابرخانواده از عوامل رونویسی تعلق دارند که در تنظیم ریخت‌زایی و رشد در یوکاریوت‌ها نقش دارند. دمین Homeobox معمولاً از ۶۰ تا ۶۶ اسیدآمینو حفظ شده تشکیل شده است که به‌عنوان یک ناحیه متصل‌شونده به DNA عمل کرده و در فعال‌سازی یا سرکوب بیان ژن‌ها مشارکت دارد (Burglin and Affolter, 2016). نخستین ژن HB در مگس سرکه (*Drosophila melanogaster*) شناسایی شد و ارتولوگ‌های آن سپس در قارچ‌ها و گیاهان نیز یافت شدند (Holland, 2013). در گیاهان، نخستین ژن HB در ذرت به نام *KNOTTED-1* شناسایی شد که در تقسیم رگبرگ‌ها نقش دارد (Vollbrecht et al., 1991). پروتئین‌های HB گیاهی براساس موتیف‌های حفاظت‌شده در توالی به ۱۴ گروه تقسیم می‌شوند که شامل HD, DDT, BEL, ZIP I تا IV, KNOX, LD, NDX, PLINC, PHD, SAWADEE, PINTOX, WOX و هستند (Mukherjee et al., 2009). در گیاهان عالی، ژن‌های *WOX* (*WOX*-WUSCHEL related homeobox) ناحیه Homeobox مربوط به خانواده WUSCHEL را کد می‌کنند که یک خانواده خاص از عوامل رونویسی گیاهی هستند. این ژن‌ها پیش‌تر در گیاهانی مانند *Arabidopsis*، برنج، ذرت، سویا و سایر گونه‌ها شناسایی و توصیف شده‌اند (Hao et al., 2019). اعضای خانواده ژنی *WOX* براساس روابط تکاملی فیلوژنتیکی به سه دودمان تقسیم می‌شوند: دودمان WUS یا مدرن که فقط در گیاهان دانه‌دار وجود دارد، دودمان *WOX9* یا حدواسط که در گیاهان آوندی یافت می‌شود، و دودمان *WOX13* یا باستانی که هم در گیاهان آوندی و هم غیرآوندی حضور دارد (Lin et al., 2013). کنجد (*Sesamum indicum* L.) به‌عنوان یکی از گونه‌های متحمل به خشکی در میان محصولات مهم زیررده *Asteridae* شناخته می‌شود و عمدتاً در مناطق خشک و نیمه‌خشک با دماهای بالا و وقوع مکرر خشکی کشت می‌شود (Dossa et al., 2016). هرچند این گیاه به‌طور طبیعی از تحمل نسبی خوبی در برابر کم‌آبی برخوردار است، اما تنش خشکی همچنان موجب کاهش قابل‌توجه عملکرد آن می‌شود (Bahrami et al., 2012; Zabet et al., 2023) و یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید کنجد محسوب می‌گردد (Pathak et al.,

می‌شوند و امکان پیش‌بینی رفتار پروتئین‌ها در شرایط مختلف و انتخاب منطقی ژن‌ها و پروتئین‌ها برای آزمایش‌های بعدی، مانند تحلیل بیان یا مدل‌سازی ساختار سه‌بعدی، را فراهم می‌کنند. میانگین کل GRAVY یکی از پارامترهای مهمی است که از تقسیم مجموع مقادیر هیدروپاتی برای تمام اسیدهای آمینه بر تعداد کل اسیدهای آمینه به دست می‌آید و نشان‌دهنده شاخص آبریزی پروتئین است. برای بررسی ویژگی‌های پروتئینی و ساختاری خانواده ژنی *WOX* در کنجد، ابتدا توالی‌های پروتئینی این ژن‌ها جمع‌آوری شد و سپس ویژگی‌های عمومی مانند طول پروتئین، وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک با استفاده از ابزار ProtParam ارزیابی گردید (<http://web.expasy.org/protparam>) (Chen et al., 2020). در مرحله بعد، برای پیش‌بینی جایگاه سلولی پروتئین‌های *WOX* از سرور WOLF PSORT استفاده شد (<https://wolfsort.hgc.jp/>). این سرور به شناسایی جایگاه‌های احتمالی درون سلول که پروتئین‌ها در آن‌ها فعالیت می‌کنند، کمک می‌کند و می‌تواند به تعیین نقش سلولی پروتئین‌ها بپردازد. برای رسم درخت فیلوژنتیکی و تحلیل روابط تکاملی بین ژن‌های *WOX*، ابتدا توالی‌های پروتئینی این ژن‌ها در گیاه آرآبیدوپسیس و گیاه کنجد جمع‌آوری و در مرحله بعد، هم‌ردیفی این توالی‌های پروتئینی با استفاده از سرور ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) انجام شد. ClustalW ابزار قدرتمندی برای هم‌ردیفی توالی‌ها است که به هم‌ردیف کردن و مقایسه توالی‌های پروتئینی مشابه کمک می‌کند و نتایج این هم‌ردیفی در فرمت FASTA ذخیره می‌شود. برای تحلیل فیلوژنتیکی اعضای خانواده ژنی *WOX* در کنجد، ابتدا توالی‌های آمینواسیدی جمع‌آوری شد و سپس در نرم‌افزار MEGA (نسخه ۷) با استفاده از روش Maximum Likelihood تحلیل گردید. برای ارزیابی اطمینان در شاخه‌های درخت فیلوژنی، ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap اعمال شد. این روش امکان تعیین روابط تکاملی و گروه‌بندی ژن‌ها را بر اساس توالی‌های پروتئینی فراهم می‌کند و شاخه‌های با مقادیر بالای Bootstrap نشان‌دهنده اطمینان بیشتر در جایگاه فیلوژنتیکی ژن‌ها هستند.

برای شناسایی عناصر تنظیمی سیس پاسخ‌دهنده به هورمون‌ها و تنش‌ها در خانواده ژنی *WOX*، ابتدا حدود ۲۰۰۰ جفت‌باز از

تنش خشکی است. شناسایی عملکردی ژن‌های *WOX* تحت تنش خشکی می‌تواند زمینه‌ساز معرفی ژن‌های کاندید مؤثر برای بهبود تحمل خشکی و در نهایت افزایش بهره‌وری و پایداری تولید کنجد باشد.

مواد و روش‌ها

شناسایی و تحلیل خانواده ژنی *WOX*: برای شناسایی اعضای خانواده ژنی *WOX* در گیاه کنجد، در مرحله اول، توالی پروتئینی *WOX* از پایگاه داده TAIR استخراج گردید (<https://www.arabidopsis.org>). این توالی به‌عنوان الگو برای شناسایی توالی‌های همولوگ در پایگاه داده NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) مورد استفاده قرار گرفت و نتایج حاصل با ژنوم گیاه کنجد تطبیق داده شد و توالی‌های مشابه با استفاده از الگوریتم tBLASTn و بر اساس معیارهای $E\text{-value} \leq 1e^{-5}$ ، درصد شباهت (identity) بیشتر/مساوی ۶۰ درصد و پوشش توالی (coverage) بیشتر/مساوی ۵۰ درصد شناسایی شدند. برای افزایش دقت تحلیل، توالی‌های تکراری و نتایج احتمالی نادرست پس از این مرحله به‌صورت دستی حذف گردیدند. معیار حذف ژن‌های تکراری شامل: ۱) حذف توالی‌هایی با شناسه ژنی یکسان که در نتایج جستجو بیش از یک‌بار ظاهر شده بودند و ۲) حذف توالی‌هایی فاقد دُمین اختصاصی مورد انتظار بر اساس بررسی در پایگاه‌های Pfam و SMART بود. توالی‌های باقی‌مانده به سرور SMART ارسال شد تا دُمین‌های خاص *WOX* در آن‌ها شناسایی شود.

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها پارامترهایی هستند که رفتار پروتئین را از نظر ساختار، بار، پایداری و خواص شیمیایی مشخص می‌کنند. این ویژگی‌ها شامل طول آمینواسید و وزن مولکولی (MW) برای تعیین اندازه و ساختار پروتئین، شاخص ایزوالکتریک (pI) برای پیش‌بینی محلولیت و تعامل پروتئین با محیط، بار خالص و درصد آمینواسیدهای قطبی و غیرقطبی برای بررسی رفتار پروتئین در محلول‌های آبی و احتمال تعامل با سایر مولکول‌ها، و شاخص‌های پایداری مانند Instability Index (شاخص ناپایداری)، Aliphatic Index (شاخص آلیفاتیک) و GRAVY (هیدروپاتی) برای ارزیابی پایداری و میزان آب‌دوستی یا آب‌گریزی پروتئین است. این تحلیل‌ها بر اساس توالی آمینواسیدی و با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی مانند ProtParam, Expasy و TBtools انجام

توزیع و فراوانی اسیدهای آمینه را در هر موقعیت از دمین‌های محافظت‌شده به صورت گرافیکی نمایش می‌دهد، به طوری که اسیدهای آمینه با حفاظت‌شدگی بالاتر، با اندازه بزرگ‌تر نشان داده می‌شوند. این روش امکان بررسی ویژگی‌های ساختاری و عملکردی دمین‌های محافظت‌شده پروتئین‌های SiWOX را فراهم کرد.

برای بررسی روابط تکاملی خانواده ژنی *WOX*، یک تحلیل سیستمی با استفاده از پلتفرم آنلاین BAT (<https://bat.infspire.org/>) انجام شد. در این تحلیل، توالی‌های پروتئینی *Arabidopsis thaliana* به عنوان مجموعه مرجع (query) و توالی‌های پروتئینی *Sesamum indicum* به عنوان ژنوم هدف مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج به دست آمده در قالب یک نمودار دایره‌ای (circo plot) به تصویر کشیده شد که امکان شناسایی جفت‌های ژنی تکرار شده و ارزیابی حفظ تکاملی آن‌ها را فراهم می‌کند.

تحلیل بیان ژن‌های *WOX*: تحلیل بیان ژن‌های *WOX* در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۴۰۴ انجام گرفت. برای بررسی الگوی بیانی ژن‌های *WOX* در کنگد تحت تنش خشکی، بذره‌های دو رقم سرداری و دشتستان از مؤسسه تحقیقات کشاورزی کرج تهیه شدند. پس از ضد عفونی سطحی، بذرها در شرایط هیدروپونیک در اتاق رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کشت داده شدند. دو هفته پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها تحت تنش اسمزی کنترل شده با استفاده از پلی اتیلن گلیکول با وزن مولکولی ۶۰۰۰ (PEG 6000) و در سطح پتانسیل اسمزی ۳- بار قرار گرفتند؛ سطحی که بر اساس گزارش جاتا و همکاران (Jatav et al., 2021) به عنوان تنش اسمزی متوسط برای شبیه‌سازی شرایط کم‌آبی در شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفته است. بر اساس تجزیه و تحلیل صفات مختلف ژنوتیپ سرداری به عنوان رقم متحمل و رقم دشتستان به عنوان رقم نیمه حساس شناسایی شدند (Padyab et al., 2025). نمونه برداری از برگ در زمان‌های ۰ (شاهد)، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) اجرا شد و برای هر تیمار و زمان نمونه برداری، سه تکرار زیستی در نظر گرفته شد که هر تکرار شامل برگ‌های جمع‌آوری شده از پنج گیاه به طور تصادفی بود.

توالی‌های پروموتری *WOX* از پایگاه داده NCBI دریافت و به فرمت FASTA ذخیره شدند. توالی‌ها در وبسایت PLANTCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/>) بارگذاری و تحلیل شدند تا عناصر تنظیمی سیس مرتبط با هورمون‌ها و تنش‌ها شناسایی شوند و نتایج به صورت فایل متنی یا Excel ذخیره گردید، سپس از نرم‌افزار TBtools برای وارد کردن توالی‌های پروموتری و نتایج PLANTCARE استفاده شد. با بهره‌گیری از ابزارهای TBtools نمودارها و گراف‌های توزیع عناصر تنظیمی سیس ترسیم شده و به فرمت‌های PNG و PDF ذخیره شدند تا برای تحلیل‌های بیشتر و گزارش آماده گردند. توالی‌های DNA ژنومی و CDS از پایگاه NCBI دریافت و به فرمت FASTA ذخیره شد. این توالی‌ها برای تحلیل ساختار ژن‌ها استفاده شد. ساختار آگزون-اینترون و فاز ایترونی ژن‌های *WOX* در گیاه کنگد با استفاده از نرم‌افزار GSDS (<http://gsds.gao-lab.org>) بررسی شدند. برای شناسایی دمین‌های حفاظت‌شده در خانواده ژنی *WOX*، توالی‌های پروتئینی یا نوکلئوتیدی مربوطه از پایگاه‌های داده ژنتیکی جمع‌آوری شده و به فرمت FASTA ذخیره شد. دمین‌های حفاظت‌شده توالی‌های پروتئینی *WOX* با بهره‌گیری از ابزار آنلاین CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) شناسایی شدند. خروجی تحلیل در قالب فرمت hitdata دریافت گردید که شامل اطلاعاتی از قبیل نام دمین، موقعیت آغاز و پایان و مقدار E-value بود. توالی‌های پروتئینی *WOX* نیز در قالب فایل FASTA آماده شده و شناسه هر توالی با شناسه‌های متناظر در فایل hitdata هماهنگ گردید. در ادامه، هر دو فایل در سامانه Protein Domain Visualization نرم‌افزار Tbttools وارد شدند. در این مرحله، برای هر دمین رنگ‌های مجزا به صورت خودکار اختصاص یافت و گراف دمین‌های پروتئینی به صورت گرافیکی ترسیم شد. در پایان، خروجی نهایی گراف‌ها در قالب فرمت با کیفیت PNG استخراج گردید. لوگوهای توالی دمین‌های محافظت‌شده در توالی‌های پروتئینی SiWOX با استفاده از نرم‌افزار WEBLOGO (<http://weblogo.berkeley.edu/>) ایجاد شدند. توالی‌های پروتئینی SiWOX پس از هم‌ترازی در نرم‌افزار MEGA با روش ClustalW هم‌ردیف شدند، سپس خروجی هم‌ترازی برای تحلیل در نرم‌افزار WEBLOGO استفاده شد. این نرم‌افزار

LRRFIP superfamily است که عمدتاً با تعاملات پروتئین-پروتئین و فرآیندهای پیام‌رسانی سلولی مرتبط هستند. این مشخصه‌ها نشان می‌دهد که ژن *SiWOX36* احتمالاً از طریق مسیرهای تنظیمی و سیگنال‌دهی متفاوت در پاسخ به تنش خشکی مشارکت دارد. ژن *SiWOX9* اگرچه دمین محافظت‌شده Homeodomain را داراست، اما فاقد بسیاری از دمین‌های کمکی مشاهده‌شده در دو ژن دیگر است و ساختاری کلاسیک‌تر از خانواده ژنیگ *WOX* دارد؛ بنابراین، این ژن به‌عنوان ژن مهم برای مقایسه الگوهای بیان میان اعضای دارای تنوع ساختاری و اعضای محافظت‌شده انتخاب شد. علاوه بر این، تحلیل فیلوژنتیکی نشان داد که ژن‌های *SiWOX9*، *SiWOX16* و *SiWOX36* در شاخه‌های فیلوژنتیکی متفاوت قرار می‌گیرند، که بیانگر واگرایی تکاملی و احتمال عملکردهای متفاوت آن‌ها در تنظیم رشد و پاسخ به تنش خشکی در کنجد است (جدول ۱). ژن *18S rRNA* به‌عنوان ژن مرجع در مطالعه حاضر انتخاب گردید.

واکنش qRT-PCR با دستگاه StepOne Real-Time PCR System شرکت Applied Biosystems انجام شد. حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر بود که شامل ۱۰ میکرولیتر محلول SYBR Premix ExTaq™ (2x)، ۱ میکرولیتر cDNA رقیق‌شده (۱:۱۰)، ۰/۴ میکرولیتر از آغازگرهای مستقیم و معکوس (با غلظت ۱۰ پیکومول)، و ۸/۲ میکرولیتر آب دی‌یونیزه بود. شرایط چرخه حرارتی شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۴۰ چرخه شامل ۹۵ درجه برای ۵ ثانیه و ۶۰ درجه برای ۳۰ ثانیه بود. واکنش برای هر نمونه در سه تکرار فنی اجرا شد. میزان بیان ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) محاسبه شد. ژن‌هایی که تغییر معنی‌داری در بیان داشتند با آزمون t و در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ یا $p < 0.01$ مشخص شدند.

بلافاصله پس از برداشت، نمونه‌ها در نیتروژن مایع فریز شده و در دمای -70°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA کل از نمونه‌ها با استفاده از کیت RNxplus (شرکت سیناکلون، تهران) انجام شد. برای حذف هر گونه DNA ژنومی باقی‌مانده، نمونه‌های RNA با *DNase I* تیمار شدند. حذف کامل DNA ژنومی با انجام واکنش‌های PCR بدون رونویسی معکوس (کنترل‌های no-RT) تأیید گردید؛ عدم مشاهده تکثیر PCR در این کنترل‌ها نشان‌دهنده حذف موفقیت‌آمیز DNA ژنومی بود. این رویکرد اطمینان می‌دهد که سنتز cDNA و تحلیل‌های qPCR بعدی تنها بیان واقعی ژن‌ها را نشان می‌دهد. سنتز cDNA رشته اول با استفاده از کیت First-Strand cDNA Synthesis SuperMix TransScript (شرکت یکتا تجهیز، نمایندگی ترانس‌ژن) صورت گرفت. آغازگرهای اختصاصی برای سه ژن انتخاب‌شده *WOX* (*SiWOX9*، *SiWOX16* و *SiWOX36*) با استفاده از نرم‌افزار Primer3.0 طراحی شدند. انتخاب این ژن‌ها برای بررسی الگوی بیان تحت تنش خشکی مبتنی بر تحلیل ساختار دمینی (شکل ۴) و طبقه‌بندی فیلوژنتیکی انجام شد. تمامی اعضای خانواده ژنی *WOX* دارای دمین محافظت‌شده Homeodomain هستند که برای اتصال به DNA و تنظیم رونویسی ضروری است، اما این سه ژن تفاوت‌های ساختاری قابل‌توجهی در دمین‌ها و موتیف‌های اضافی دارند که نشان‌دهنده تخصص‌یافتگی عملکردی آن‌هاست. ژن *SiWOX16* علاوه بر Homeodomain، دارای دمین‌های *bZIP_2* و *HD-ZIP_N* است که در اتصال به DNA و تنظیم بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش، به‌ویژه از طریق مسیرهای هورمونی مانند اسید آبسزیک (ABA) و اکسین نقش دارند. این ویژگی‌ها نشان می‌دهد که ژن *SiWOX16* ممکن است در شبکه‌های تنظیمی مرتبط با تنش خشکی فعالیت مهمی داشته باشد. در مقابل، ژن *SiWOX36* دارای دمین‌های خاصی مانند *Myosin_tail_1*

جدول ۱- توالی آغازگرهای سه ژن *SiWOX9*، *SiWOX16* و *SiWOX36*

Table 1. Primer sequences and amplicon size of *SiWOX9*، *SiWOX16*، and *SiWOX36* genes

| نام ژن Gene name | توالی آغازگر Primer sequence | طول ناحیه تکثیرشونده Amplicon length |
|---------------------|---------------------------------|---|
| <i>SiWOX9</i> | F 5-ACCACCAACCTAATAAACCCC-3 | 218 |
| | R 5-ATCCACCACCTGAATCCTCC-3 | |
| <i>SiWOX16</i> | F 5-GCTTTTGGGCACATTGAGGG-3 | 138 |
| | R 5-GAAGAGTAGCGGTGGAGTCG-3 | |
| <i>SiWOX36</i> | F 5-TCCTCTCTCTCTCTCTC-3 | 239 |
| | R 5-ATTGCTTGCTGCTGCTG-3 | |

نتایج و بحث

در این مطالعه ۳۶ ژن در خانواده ژنی *WOX* در کنجد شناسایی شد. در *Arabidopsis thaliana*، ۱۵ ژن *WOX*، در برنج ۱۳ ژن و در ذرت ۲۱ ژن شناسایی شده‌اند (Haecker et al., 2004; Van der Graaff et al., 2009; Zhang et al., 2010). پراکندگی آن‌ها در سطح کروموزوم‌ها نسبتاً نامتقارن بوده و بیشترین تراکم مربوط به کروموزوم‌های ۱ و ۲ بود. بررسی ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی پروتئین‌های رمزگذاری شده توسط این پروتئین‌ها نشان داد که طول آن‌ها در بازه‌ای از ۱۷۵ (SiWOX16) تا ۸۵۳ اسید آمینه (SiWOX33) قرار دارد و میانگین طول کلی حدود ۲۶۰ اسید آمینه است. وزن مولکولی این پروتئین‌ها نیز از ۲۰۱۱۳/۴۵ دالتون برای (SiWOX16) تا ۹۳۵۱۸/۶۲ دالتون برای (SiWOX33) متغیر بوده و نشان‌دهنده تنوع ساختاری میان اعضای خانواده است. نقطه ایزوالکتریک (pI) که بیانگر ویژگی بار خالص پروتئین در pH خاص است، بین ۴/۹۹ (SiWOX4) تا ۹/۵۶ (SiWOX29) ثبت شد که بیانگر تفاوت در رفتارهای شیمیایی این پروتئین‌ها در محیط‌های مختلف است (جدول ۲).

مقادیر شاخص GRAVY (میانگین کلی آب‌دوستی/آب‌گریزی) که نشان‌دهنده میزان آب‌دوستی یا آب‌گریزی پروتئین است، برای تمام پروتئین‌های *SiWOX* منفی بود و در بازه ۰/۰۷۳- تا ۱/۰۰۷- (SiWOX28) قرار گرفت که نشان می‌دهد تمامی این پروتئین‌ها ماهیت آب‌دوست دارند. همچنین، شاخص آلیفاتیک این پروتئین‌ها که معیاری برای پایداری گرمایی محسوب می‌شود، از ۵۰ (SiWOX18) تا ۹۲/۵۵ (SiWOX17) متغیر بود و بیانگر پایداری نسبتاً بالای آن‌ها در شرایط محیطی متغیر است. نتایج پیش‌بینی محل درون سلولی پروتئین‌های خانواده *WOX* در کنجد نشان داد که بیشتر پروتئین‌های این خانواده در هسته قرار دارند که این امر با نقش شناخته‌شده *WOX*‌ها به عنوان عوامل رونویسی هماهنگ است. علاوه بر آن، در برخی ژن‌ها حضور در سیتوپلاسم، کلروپلاست، میتوکندری، پراکسی‌زوم، واکوئول و غشای پلاسمایی نیز مشاهده شد که بیانگر نقش‌های احتمالی مکمل

در تنظیم فرآیندهای سلولی مختلف از جمله پاسخ به تنش، فتوسنتز و متابولیسم انرژی است. به‌ویژه پروتئین‌هایی مانند SiWOX02، SiWOX14، SiWOX17 و SiWOX23 دارای چندین محل پیش‌بینی شده بودند که می‌تواند نشان‌دهنده جابه‌جایی یا عملکرد چندگانه آن‌ها در سلول باشد. همچنین، برخی از پروتئین‌ها مانند SiWOX26 و SiWOX28 مشابه پروتئین At5g60690.1 در *Arabidopsis thaliana* تشخیص داده شدند که در کلاس هسته‌ای قرار دارد و این موضوع اعتبار نتایج به‌دست‌آمده را تأیید می‌کند (جدول ۲ و شکل ۱).

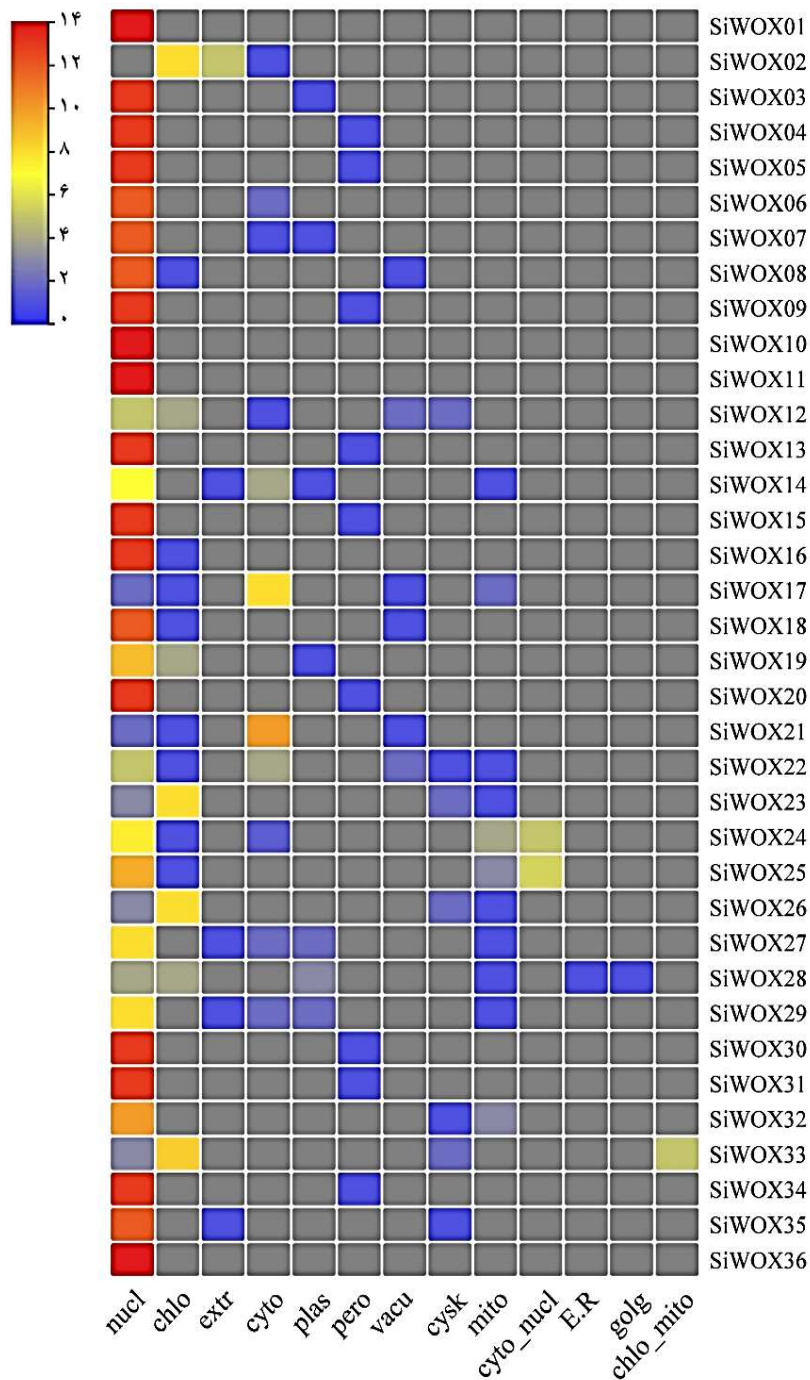
به‌منظور بررسی روابط تکاملی بین اعضای خانواده ژنی *WOX* درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی‌های آمینواسیدی پیش‌بینی شده از ژن‌های *WOX* در کنجد (*SiWOX*) و آرآیدوپسیس (*AtWOX*) ترسیم شد (شکل ۲). درخت فیلوژنی حاصل، منجر به خوشه‌بندی ژن‌ها در چهار گروه مجزا گردید که هر گروه با رنگ مشخصی نمایش داده شد. بیشترین تعداد ژن در گروه آبی با ۲۰ ژن، مشاهده شد. کمترین تعداد ژن مربوط به شاخه قهوه‌ای بود که تنها شامل پنج ژن از هر دو گونه بود. مقادیر Bootstrap در محل انشعاب‌ها به‌عنوان شاخصی برای ارزیابی اطمینان آماری گروه‌ها محاسبه شد و مقادیر بالا نشان‌دهنده اعتبار بالای خوشه‌بندی‌ها بود. نتایج به‌دست‌آمده بیانگر آن است که ساختار ژنی *WOX* در طول تکامل بین‌گونه‌ای تا حد زیادی محافظت شده است، که این موضوع می‌تواند مبنایی برای پیش‌بینی عملکرد ژن‌های *SiWOX* بر اساس هم‌خانواده‌های آن‌ها در آرآیدوپسیس باشد (Van der Graaff et al., 2009). بر اساس مطالعات پیشین، پروتئین‌های *WOX* در *Arabidopsis* به سه شاخه اصلی تقسیم می‌شوند (Wu et al., 2019) و نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان داد که پروتئین‌های *WOX* در کنجد همانند بسیاری از گونه‌های گیاهی دیگر، در سه شاخه فیلوژنتیکی مجزا قرار می‌گیرند (Lian et al., 2014; Wu et al., 2019) (شکل ۲). این هم‌ترازی خوشه‌ها بین گونه‌ها، علاوه بر تأیید الگوی تکاملی مشترک، می‌تواند در شناسایی ژن‌های کلیدی مرتبط با فرایندهای رشد و تکوین کنجد و همچنین در برنامه‌های به‌نژادی ژنتیکی این گیاه مورد استفاده قرار گیرد.

جدول ۲- فهرست ۳۶ ژن *WOX* شناسایی شده در کنجد، ویژگی‌های پروتئین آن‌ها و مکان‌یابی زیرسلولیTable 2. List of 36 identified *WOX* genes in sesame, their sequence features, and subcellular localization

| نام | گروه | موقعیت | طول | وزن مولکولی | نقطه ایزوالکتریک | (آسپارژین + گلوتامین) | (آرژینین + لیزین) | مکان‌یابی |
|----------------|---------------|-------------------|-------------|----------------|---------------------|--------------------------|----------------------|---|
| Gene name | Linkage group | Start and End | Length (aa) | MW (kDa) | pI | (Asp + Glu) | (Arg + Lys) | Subcellular localization |
| <i>SiWOX01</i> | LG01 | 9307691-9310369 | 221 | 24.777 | 6.02 | 31 | 28 | nucl: 14 |
| <i>SiWOX02</i> | LG01 | 11869357-11862772 | 845 | 92.378 | 5.96 | 87 | 77 | chlo: 8, extr: 5, cyto: 1 |
| <i>SiWOX03</i> | LG01 | 13966545-13969909 | 351 | 39.789 | 6.2 | 42 | 37 | nucl: 13, plas: 1 |
| <i>SiWOX04</i> | LG01 | 15178310-15180598 | 364 | 40.149 | 4.99 | 57 | 44 | nucl: 13, pero: 1 |
| <i>SiWOX05</i> | LG01 | 16506768-16504182 | 304 | 33.976 | 8.46 | 37 | 40 | nucl: 13, pero: 1 |
| <i>SiWOX06</i> | LG01 | 9234035-9236969 | 352 | 40.375 | 9.11 | 38 | 47 | nucl: 12, cyto: 2 |
| <i>SiWOX07</i> | LG02 | 6568743-6567130 | 247 | 27.804 | 9.25 | 28 | 34 | nucl: 12, cyto: 1, plas: 1 |
| <i>SiWOX08</i> | LG02 | 10738439-10740913 | 257 | 28.091 | 5.81 | 26 | 21 | nucl: 12, chlo: 1, vacu: 1 |
| <i>SiWOX09</i> | LG02 | 10444538-10445549 | 231 | 25.740 | 8.91 | 37 | 42 | nucl: 13, pero: 1 |
| <i>SiWOX10</i> | LG02 | 15181435-15184279 | 331 | 37.718 | 9.1 | 37 | 46 | nucl: 14 |
| <i>SiWOX11</i> | LG02 | 15262273-15264616 | 212 | 24.006 | 8.74 | 27 | 31 | nucl: 14 |
| <i>SiWOX12</i> | LG03 | 8290214-8296829 | 840 | 92.258 | 6.28 | 87 | 79 | nucl: 5, chlo: 4, vacu: 2, cysk: 2, cyto: 1 |
| <i>SiWOX13</i> | LG03 | 16326391-16324701 | 269 | 29.915 | 8.71 | 37 | 42 | nucl: 13, pero: 1 |
| <i>SiWOX14</i> | LG03 | 21851589-21849882 | 237 | 27.238 | 8.52 | 33 | 36 | nucl: 7, cyto: 4, mito: 1, plas: 1, extr: 1 |
| <i>SiWOX15</i> | LG04 | 367287-365616 | 325 | 36.157 | 7.58 | 43 | 44 | nucl: 13, pero: 1 |
| <i>SiWOX16</i> | LG04 | 13103515-13104874 | 175 | 20.113 | 8.43 | 22 | 24 | nucl: 13, chlo: 1 |
| <i>SiWOX17</i> | LG04 | 15028495-15015420 | 835 | 91.678 | 5.86 | 86 | 74 | cyto: 8, nucl: 2, mito: 2, chlo: 1, vacu: 1 |
| <i>SiWOX18</i> | LG04 | 17235642-17233986 | 248 | 28.295 | 8.7 | 22 | 25 | nucl: 12, chlo: 1, vacu: 1 |
| <i>SiWOX19</i> | LG05 | 16670030-16672793 | 263 | 28.425 | 5.97 | 26 | 23 | nucl: 9, chlo: 4, plas: 1 |
| <i>SiWOX20</i> | LG06 | 11199920-11201843 | 307 | 34.140 | 8.15 | 40 | 42 | nucl: 13, pero: 1 |
| <i>SiWOX21</i> | LG06 | 17019333-17013344 | 841 | 92.750 | 6 | 88 | 78 | cyto: 10, nucl: 2, chlo: 1, vacu: 1 |
| <i>SiWOX22</i> | LG07 | 8255794-8239690 | 831 | 91.822 | 5.99 | 87 | 74 | nucl: 5, cyto: 4, vacu: 2, chlo: 1, mito: 1, cysk: 1 |
| <i>SiWOX23</i> | LG08 | 273987-280075 | 847 | 93.117 | 6.18 | 90 | 82 | chlo: 8, nucl: 3, cysk: 2, mito: 1 |
| <i>SiWOX24</i> | LG08 | 7910735-7913800 | 391 | 42.430 | 6.86 | 31 | 30 | nucl: 7.5, cyto_nucl: 5, mito: 4, cyto: 1.5, chlo: 1 |
| <i>SiWOX25</i> | LG08 | 7910735-7913800 | 364 | 39.766 | 7.77 | 28 | 29 | nucl: 9.5, cyto_nucl: 5.5, mito: 3, chlo: 1 |
| <i>SiWOX26</i> | LG09 | 2178059-2170825 | 838 | 91.785 | 6 | 87 | 75 | chlo: 8, nucl: 3, cysk: 2, mito: 1 similar to seq At5g60690.1 of class nucl |
| <i>SiWOX27</i> | LG09 | 2705372-2707186 | 207 | 24.187 | 9.34 | 16 | 24 | nucl: 8, cyto: 2, plas: 2, mito: 1, extr: 1 |
| <i>SiWOX28</i> | LG09 | 5519865-5528848 | 839 | 91.852 | 5.81 | 88 | 74 | chlo: 4, nucl: 4, plas: 3, mito: 1, E.R.: 1, golg: 1 similar to seq At5g60690.1 of class nucl |
| <i>SiWOX29</i> | LG09 | 5038479-5035598 | 181 | 21.025 | 9.56 | 14 | 24 | nucl: 8, cyto: 2, plas: 2, mito: 1, extr: 1 |
| <i>SiWOX30</i> | LG11 | 2731873-2728727 | 315 | 35.432 | 8.64 | 40 | 45 | nucl: 13, pero: 1 |
| <i>SiWOX31</i> | LG11 | 5681389-5679695 | 373 | 41.055 | 5.89 | 53 | 49 | nucl: 13, pero: 1 |
| <i>SiWOX32</i> | LG12 | 4580359-4577201 | 385 | 42.718 | 6.71 | 33 | 32 | nucl: 10, mito: 3, cysk: 1 |
| <i>SiWOX33</i> | LG12 | 5562726-5556645 | 853 | 93.518 | 5.85 | 89 | 78 | chlo: 8.5, chlo_mito: 5, nucl: 3, cysk: 2 |
| <i>SiWOX34</i> | LG15 | 4439230-4441002 | 269 | 29.917 | 8.05 | 38 | 40 | nucl: 13, pero: 1 |
| <i>SiWOX35</i> | LG15 | 7639150-7635656 | 270 | 30.229 | 5.61 | 34 | 28 | nucl: 12, extr: 1, cysk: 1 |
| <i>SiWOX36</i> | LG15 | 7208064-7210107 | 284 | 31.881 | 6.46 | 32 | 30 | nucl: 14 |

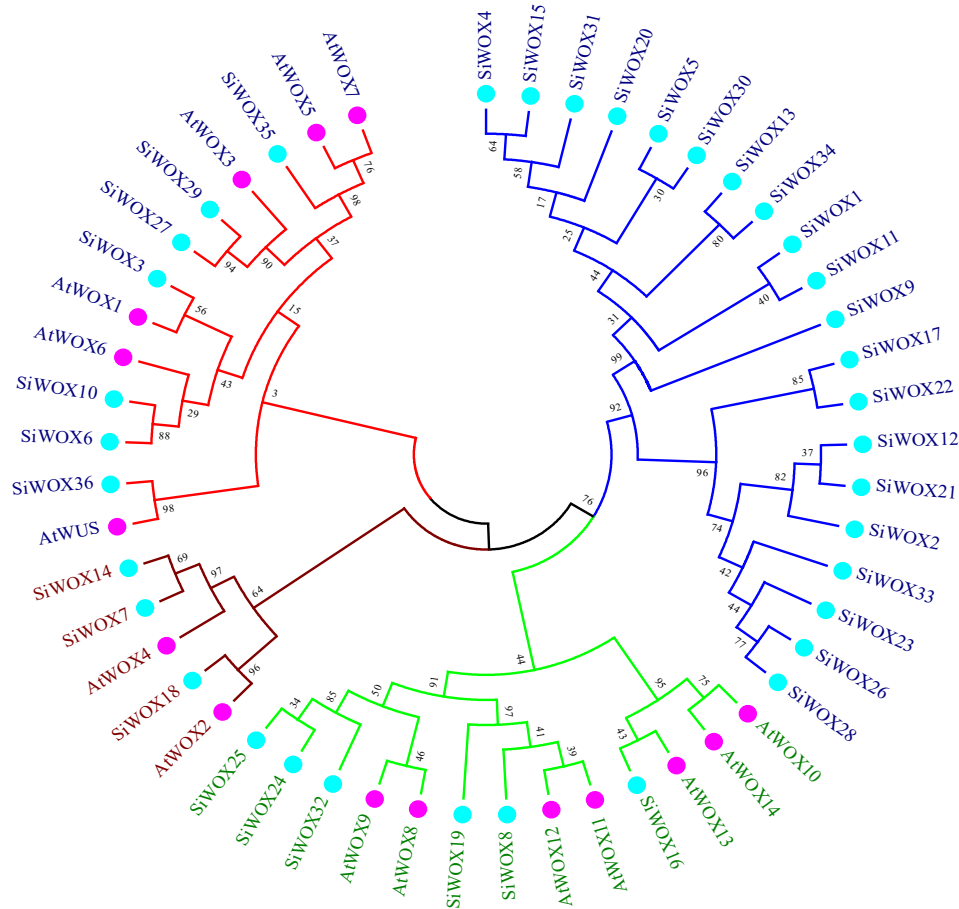
aa: اسیدهای آمینه؛ kDa: کیلو دالتون؛ نتایج پیش‌بینی نرم‌افزار WoLF PSORT نشان داد که پروتئین‌های مورد بررسی در اندامک‌های مختلفی از جمله هسته (nucl)، کلروپلاست (chlo)، سیتوپلاسم (cyto)، اسکلت سلولی (cysk)، غشای پلاسمایی (plas)، پراکسی‌زوم (pero)، میتوکندری (mito)، فضای خارج سلولی (extr)، واکوئل (vacu)، دستگاه گلژی (golg) و شبکه آندوپلاسمی (E.R.)

aa; amino acids; kDa: Kilo dalton. WoLF PSORT prediction results showed multiple possible subcellular localizations including nucleus (nucl), chloroplast (chlo), cytoplasm (cyto), cytoskeleton (cysk), plasma membrane (plas), peroxisome (pero), mitochondrion (mito), extracellular space (extr), vacuole (vacu), Golgi apparatus (golg), and endoplasmic reticulum (E.R.).



شکل ۱- نمودار جایگاه زیرسلولی پروتئین‌های WOX در گیاه کنجد. این نمودار، پیش‌بینی جایگاه سلولی پروتئین‌های رمزگذاری‌شده توسط ژن‌های خانواده WOX را در گیاه کنجد نمایش می‌دهد. شدت رنگ‌ها از آبی به قرمز بیانگر افزایش احتمال حضور پروتئین در آن بخش سلولی است؛ به این معنا که رنگ قرمز نشان‌دهنده احتمال بالاتر و تجمع بیشتر پروتئین در آن اندامک یا ناحیه سلولی می‌باشد.

Figure 1. Subcellular Localization of WOX proteins in sesame. The color intensity ranges from blue to red, indicating an increasing likelihood of protein presence in the respective cellular compartment; red color signifies a higher probability and greater accumulation of the protein in that organelle or cellular region.



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی پروتئین‌های *WOX* در گیاه کنجد و *Arabidopsis*. این درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی کامل اسید آمینه‌ای ۳۶ پروتئین *WOX* کنجد و ۱۵ پروتئین *Arabidopsis* با استفاده از روش Maximum Likelihood در نرم‌افزار MEGA نسخه ۷ با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap رسم شده است. زیرخانواده‌های مختلف ژن‌های *WOX* با پس‌زمینه‌های رنگی متفاوت در کنار نام ژن‌ها مشخص شده‌اند. این درخت، روابط تکاملی بین اعضای خانواده *WOX* را نشان داده و دسته‌بندی آن‌ها در خوشه‌های مجزا را برجسته می‌سازد.

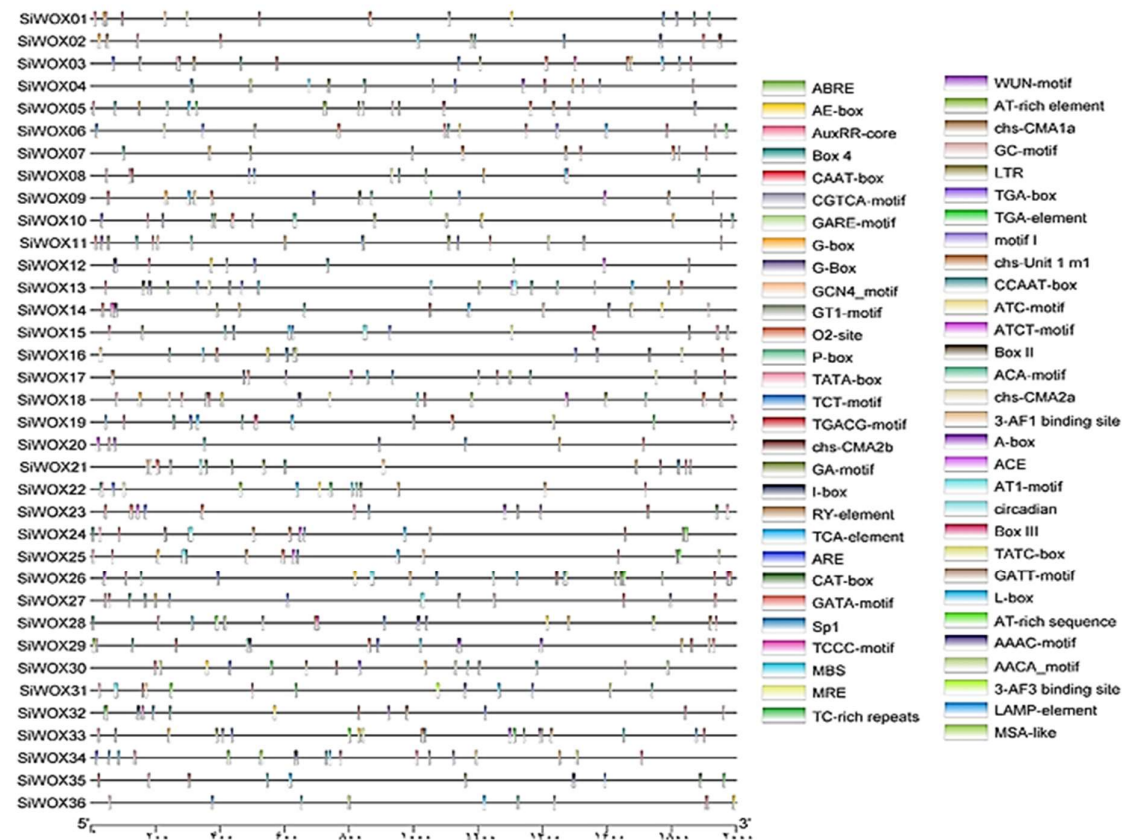
Figure 2. Phylogenetic tree of *WOX* proteins in sesame and *Arabidopsis*. This phylogenetic tree was constructed based on the full-length amino acid sequences of 36 *WOX* proteins from sesame and 15 *WOX* proteins from *Arabidopsis*, using the Maximum Likelihood method in MEGA version 7.0 with 1,000 bootstrap replicates. Different *WOX* gene subfamilies are indicated by distinct background colors next to the gene names. The tree illustrates the evolutionary relationships among members of the *WOX* family and highlights their classification into distinct clusters.

ژن‌های *WOX* در کنجد دارای تنوع فراوانی از عناصر تنظیم‌کننده سیس در نواحی پرموتوری خود هستند که نشان‌دهنده تنظیم پیچیده و چندلایه بیان این ژن‌ها می‌باشد. در مجموع، ۶۱ نوع عنصر تنظیمی سیس در ناحیه پرموتوری ژن‌های *SiWOX* شناسایی شد. عناصر اصلی پرموتر مانند TATA-box و CAAT-box در تمام ژن‌ها حضور دارند و بیشترین فراوانی آن‌ها در ژن‌های *SiWOX18*، *SiWOX16*، *SiWOX9*، *SiWOX6*، *SiWOX5*، *SiWOX4* و *SiWOX31* مشاهده شد. همچنین تحلیل عناصر سیس نشان داد که این ژن‌ها دارای مجموعه متنوعی از عناصر تنظیمی هستند که در پاسخ به شرایط نوری، هورمونی و تنش‌های محیطی نقش دارند. در میان آن‌ها، عناصر ABRE (عنصر پاسخ‌دهنده به آبسزیک اسید) و MBS (عنصر پاسخ به تنش خشکی و متصل‌شونده به MYB) در بسیاری از ژن‌ها مانند

حضور دارند و بیشترین فراوانی آن‌ها در ژن‌های *SiWOX18*، *SiWOX16*، *SiWOX9*، *SiWOX6*، *SiWOX5*، *SiWOX4* و *SiWOX31* مشاهده شد. همچنین تحلیل عناصر سیس نشان داد که این ژن‌ها دارای مجموعه متنوعی از عناصر تنظیمی هستند که در پاسخ به شرایط نوری، هورمونی و تنش‌های محیطی نقش دارند. در میان آن‌ها، عناصر ABRE (عنصر پاسخ‌دهنده به آبسزیک اسید) و MBS (عنصر پاسخ به تنش خشکی و متصل‌شونده به MYB) در بسیاری از ژن‌ها مانند

که به ترتیب در پاسخ به اسید ایندول استیک (IAA) و سالیسیلیک اسید عمل می‌کنند، در ژن‌هایی چون *SiWOX4*، *SiWOX7*، *SiWOX13* و *SiWOX20* شناسایی شدند و نشان می‌دهند که این ژن‌ها در مسیرهای سیگنال‌دهی هورمونی مشارکت دارند. وجود عناصر TC-rich repeats و WUN-motif نیز در برخی از ژن‌ها بیانگر نقش آن‌ها در پاسخ به تنش‌های دفاعی و آسیب‌های مکانیکی است. به‌طور کلی، نتایج این تحلیل بیانگر آن است که خانواده ژنی *SiWOX* در کنجد تحت تنظیم پیچیده‌ای از عناصر سیس قرار دارد که آن‌ها را قادر می‌سازد تا در فرآیندهای رشد، نمو و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش مهمی ایفا کنند (شکل ۳).

(شاخه *AtWOX5*)، *SiWOX18* و *SiWOX36* (شاخه *AtWUS*) مشاهده شدند که نشان‌دهنده نقش تنظیمی احتمالی این ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های خشکی و شوری است. وجود عناصر LTR در ژن‌هایی مانند *SiWOX4*، *SiWOX5*، *SiWOX6* و *SiWOX13* نشان می‌دهد که برخی از اعضای خانواده *SiWOX* در پاسخ به سرما فعال می‌شوند. افزون بر این، حضور عناصری مانند G-box، GT1-motif و TCT-motif در ژن‌هایی نظیر *SiWOX3*، *SiWOX10*، *SiWOX14* و *SiWOX18* می‌تواند نشان‌دهنده تنظیم این ژن‌ها توسط نور باشد و احتمالاً در رشد بافت‌های فتوسنتزی نقش دارند. همچنین، عناصر مرتبط با پاسخ به هورمون‌های رشد مانند TGA-element و TCA-element



شکل ۳- عناصر تنظیمی سیس در نواحی پروموتوری ژن‌های *WOX* در گیاه کنجد. این نمودار توزیع عناصر تنظیمی سیس را در ناحیه ۲۰۰۰ جفت‌باز بالادست از محل آغاز ترجمه ژن‌های *WOX* نشان می‌دهد. هر رنگ نشان‌دهنده نوع خاصی از عنصر تنظیمی (مانند پاسخ به هورمون‌ها، تنش‌های غیرزیستی، نور و...) است.

Figure 3. Cis-regulatory elements in the promoter regions of *WOX* genes in sesame. This diagram shows the distribution of cis-regulatory elements within the 2000 base pairs upstream of the translation start site of *WOX* genes. Each color represents a specific type of regulatory element, such as those responsive to hormones, abiotic stresses, light, and others.

هستند که ممکن است در پایداری ساختار سه‌بعدی و تنظیم تعاملات پروتئین-پروتئین نقش داشته باشد. علاوه بر این، در برخی ژن‌ها مانند *SiWOX10*، *SiWOX14*، *SiWOX16*، *SiWOX18*، *SiWOX19* و *SiWOX35* ژای bZIP_2 و HD-ZIP_N مشاهده می‌شود که این دمین‌ها در اتصال به DNA و پاسخ به تنش‌های محیطی از طریق مسیرهای تنظیم هورمونی (مانند ABA و اکسین) مؤثرند. ژن‌های دیگری مانند *SiWOX04*، *SiWOX05*، *SiWOX20* و *SiWOX30* دمین HALZ superfamily و گاهی دمین bZIP_1 را نیز دارند که بیانگر عملکردهای ترکیبی در تنظیم رشد و تمایز بافتی است. در برخی ژن‌ها، دمین‌های خاص‌تری مانند LRRFIP یا Myosin_tail_1، AC_N superfamily یا LRRFIP superfamily مشاهده می‌شود (به‌ویژه در ژن‌های *SiWOX11*، *SiWOX13*، *SiWOX34* و *SiWOX36*) که احتمالاً با تعاملات پروتئینی یا فرآیندهای سیگنال‌دهی سلولی مرتبط‌اند.

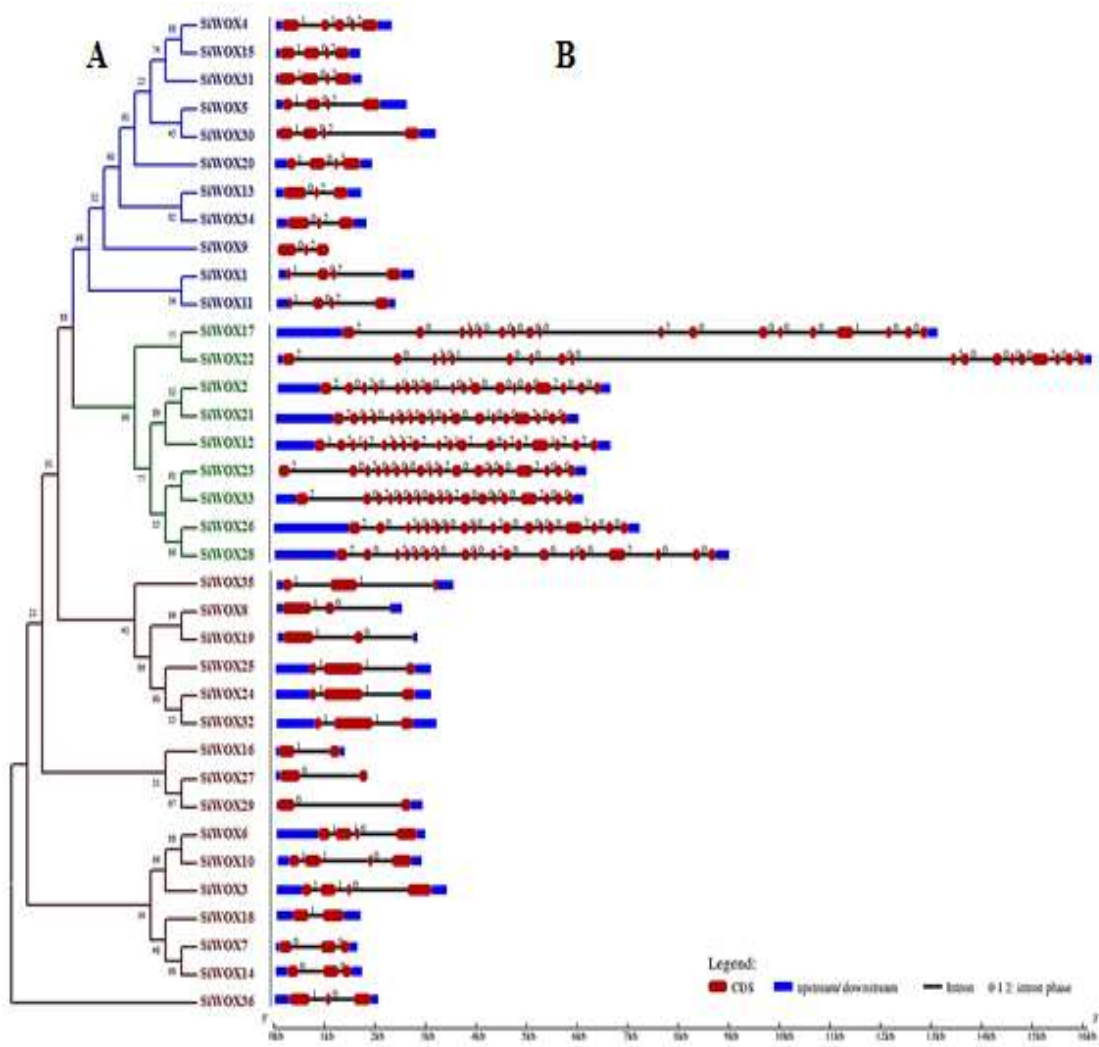
به‌طور کلی، الگوی مشاهده‌شده نشان می‌دهد که اگرچه دمین Homeodomain در تمام اعضا حفظ شده است، اما تنوع در وجود دمین‌های کمکی مانند HALZ، bZIP و HD-ZIP_N می‌تواند موجب ایجاد تفاوت‌های عملکردی در میان ژن‌های *WOX* شده باشد. این تنوع ساختاری احتمالاً نشان‌دهنده تکامل عملکردی اعضای مختلف این خانواده برای ایفای نقش در مسیرهای متفاوت رشد و پاسخ به تنش‌های محیطی در کنجد است (شکل ۵ الف). الگوی حفاظت اسیدهای آمینه در ناحیه دمین مشترک پروتئین‌های خانواده *WOX* در گیاه کنجد با استفاده از ابزار WebLogo مورد بررسی قرار گرفت. مطابق تصویر، اسیدهای آمینه‌ای مانند R (آرژینین)، K (لیزین)، W (تریپتوفان) و L (لوسین) در برخی موقعیت‌های خاص از توالی، با اندازه بزرگ‌تر نمایش داده شده‌اند که نشان‌دهنده سطح بالای حفاظت آن‌ها در بین توالی‌های مختلف است. این میزان حفاظت بالا می‌تواند بیانگر اهمیت عملکردی این نواحی بوده و به احتمال زیاد با ناحیه Homeodomain مرتبط هستند که وظیفه اتصال به DNA را بر عهده دارد. در مقابل، در بخش‌هایی از توالی که

نتایج تحلیل ساختار ژنی نشان داد که این ژن‌ها از نظر تعداد آگرون و ایترون دارای تنوع قابل‌توجهی هستند و به دو الگوی ساختاری متمایز تقسیم می‌شوند. بخش عمده‌ای از ژن‌ها مانند *SiWOX07*، *SiWOX08*، *SiWOX09*، *SiWOX14*، *SiWOX16*، *SiWOX18*، *SiWOX19*، *SiWOX27*، *SiWOX29*، *SiWOX34* و *SiWOX35* دارای ساختار ساده با ۲ تا ۳ آگرون هستند که این امر می‌تواند بیانگر فشردگی ژنومی و تسهیل در رونویسی سریع این ژن‌ها به‌ویژه در شرایط محیطی متغیر باشد. در مقابل، تعدادی از ژن‌ها از جمله *SiWOX02*، *SiWOX12*، *SiWOX17*، *SiWOX21*، *SiWOX22*، *SiWOX23*، *SiWOX26*، *SiWOX28* و *SiWOX33* دارای ساختار پیچیده با ۱۸ تا ۱۹ آگرون و تعداد متناظر ایترون می‌باشند. این ژن‌های چندآگرونی معمولاً با فرآیندهای تکوینی پیشرفته‌تر، تنظیم دقیق‌تر بیان ژن و پدیده‌هایی مانند پیرایش متناوب مرتبط‌اند که موجب افزایش تنوع عملکردی پروتئین‌ها می‌شود. از سوی دیگر، ژن‌هایی با ساختار متوسط مانند *SiWOX04*، *SiWOX05*، *SiWOX10*، *SiWOX11*، *SiWOX20*، *SiWOX30*، *SiWOX31*، *SiWOX32*، *SiWOX24* و *SiWOX25* که دارای ۴ تا ۶ آگرون هستند، ممکن است نقش میانی بین دو گروه ساده و پیچیده را ایفا کنند. به‌طور کلی، این تنوع در ساختار ژنی نشان‌دهنده تمایز عملکردی و تکاملی ژن‌های *SiWOX* در مسیرهای مختلف رشد، نمو و پاسخ به تنش‌های محیطی است (شکل ۴ ب).

بر اساس نتایج مشاهده‌شده در شکل ۴، همه‌ی اعضای خانواده ژنی *WOX* شامل دمین Homeodomain و Homeodomain superfamily هستند که نقش اصلی در اتصال به DNA و تنظیم بیان ژن‌های هدف را دارند و ویژگی اصلی پروتئین‌های *WOX* محسوب می‌شوند. برخی از ژن‌ها مانند *SiWOX02*، *SiWOX12*، *SiWOX17*، *SiWOX21*، *SiWOX22*، *SiWOX23*، *SiWOX26* و *SiWOX33* علاوه بر دمین Homeodomain، دارای دمین HALZ یا HALZ superfamily نیز در پروتئین‌های خود

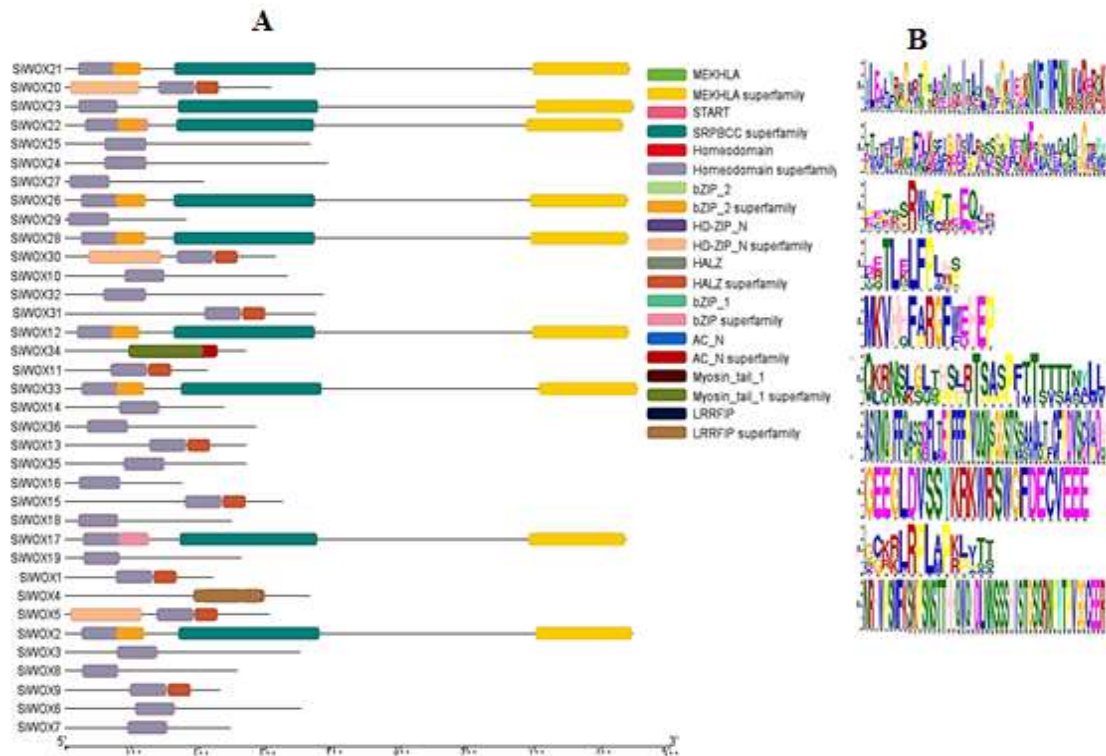
نواحی عملکردی با سطح حفاظت بالا هستند که احتمالاً در تنظیم رشد، تمایز سلولی و توسعه بافتی نقش دارند، هرچند برای تأیید قطعی این کارکردها به مطالعات عملکردی تکمیلی نیاز است (شکل ۵ ب).

حروف کوچک‌تر و متنوع‌تری مشاهده می‌شود، میزان حفاظت پایین‌تر است که می‌تواند نشان‌دهنده انعطاف‌پذیری عملکردی یا ساختاری در آن نواحی باشد. به‌طور کلی، نتایج حاصل از این تحلیل نشان می‌دهد که پروتئین‌های *WOX* در کنجد دارای



شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی (الف) و ساختار اگزون-اینترون (ب) ژن‌های *WOX* در گیاه کنجد. (الف) درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی کامل اسیدآمینه‌ای ژن‌های *WOX* کنجد، با استفاده از روش همسایگی-پیوسته و ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap در نرم‌افزار MEGA رسم شده است. زیرخانواده‌های مختلف ژن‌های *WOX* با رنگ‌های متفاوت مشخص شده‌اند. (ب) ساختار اگزون-اینترون ژن‌های *WOX* با استفاده از موقعیت‌های ژنومی به‌دست آمده از داده‌های عمومی ترسیم شده است. جعبه‌های قرمز نشان‌دهنده اگزون‌ها، خطوط سیاه نشان‌دهنده اینترون‌ها، و جعبه‌های آبی نمایانگر نواحی غیرترجمه‌ای (UTR) هستند. اعداد ۰، ۱، و ۲ فاز پیرایش را نشان می‌دهند. طول اگزون‌ها و اینترون‌ها با مقیاس پایین شکل قابل تخمین است.

Figure 4. Phylogenetic tree (A) and exon-intron structure (B) of *WOX* genes in Sesame. (A) An unrooted phylogenetic tree based on the full-length amino acid sequences of *WOX* genes in sesame was constructed using the Neighbor-Joining method with 1000 bootstrap replicates in MEGA software. Distinct colors indicate different *WOX* gene subfamilies. (B) The exon-intron structure of *WOX* genes, drawn based on genomic positions obtained from public data. Red boxes represent exons, black lines indicate introns, and blue boxes denote untranslated regions (UTRs). Numbers 0, 1, and 2 indicate splice phases. The relative lengths of exons and introns can be estimated using the scale below the figure.



شکل ۵- شناسایی دمی‌های حفاظت‌شده (الف) و لوگوی توالی آن‌ها (ب) در پروتئین‌های *WOX* گیاه کنجد. (الف) هر رنگ نشان‌دهنده یک دمی خاص بوده و موقعیت آن‌ها در طول توالی پروتئین مشخص شده است. نام دمی‌ها در سمت راست نشان داده شده‌اند و طول پروتئین‌ها با راهنمای پایین شکل قابل تخمین است. (ب) نمایش لوگوی توالی دمی‌های شناسایی‌شده با استفاده از نرم‌افزار WebLogo. ارتفاع هر حرف نشان‌دهنده میزان فراوانی اسیدآمینه در آن موقعیت از دمی است که بیانگر میزان حفاظت آن در بین ژن‌های مختلف می‌باشد.

Figure 5. Identification of conserved domains (A) and their sequence logos (B) in *WOX* proteins of sesame. (A) Each color represents a specific domain, and their positions along the protein sequences are indicated. The names of the domains are shown on the right, and the protein lengths can be estimated using the scale bar at the bottom of the figure. (B) Sequence logos of the identified domains generated using the WebLogo software. The height of each letter represents the frequency of the corresponding amino acid at that position within the domain, reflecting its degree of conservation among different genes.

باشد و احتمالاً حاکی از غالب بودن فشار انتخابی خالص‌کننده در طول فرآیند تکامل آن‌ها است (شکل ۶).

تحلیل بیان ژن‌های *WOX* در دو ژنوتیپ کنجد (سرداری و دشتستان) تحت تنش خشکی: بررسی الگوی بیان ژن‌های *SiWOX9*، *SiWOX16* و *SiWOX36* در دو ژنوتیپ سرداری (S) و دشتستان (D) نشان‌دهنده تفاوت‌های آشکار در واکنش‌های تنظیمی این ژن‌ها در برابر شرایط مختلف است. در ژنوتیپ سرداری، ژن *SiWOX9* روندی افزایشی را در طول زمان نشان داد؛ به گونه‌ای که مقدار بیان آن به ۱/۵۵ برابر در ۴۸ ساعت افزایش یافت. این افزایش تدریجی بیان، می‌تواند بیانگر نقش احتمالی این ژن در تنظیم فرآیندهای سازگاری یا بازسازی سلولی در پاسخ به تنش باشد. در مورد ژن *SiWOX16*، افزایش

تجزیه و تحلیل سیستمی بین *Arabidopsis thaliana* و *Sesamum indicum* نشان داد که ژن‌های این خانواده دارای روابط هم‌خطی گسترده‌ای بین دو گونه هستند و چندین جفت ژن ارتولوگ در کروموزوم‌های مختلف شناسایی شد. پراکندگی این ارتباط‌ها در سطح چندین کروموزوم و عدم تمرکز آن‌ها در یک ناحیه خاص بیانگر آن است که گسترش این خانواده ژنی در کنجد احتمالاً بیشتر تحت تأثیر مضاعف‌شدگی‌های قطعه‌ای یا رویدادهای تکثیر کل ژنوم بوده است، هرچند نقش مضاعف‌شدگی‌های پشت سرهم را نیز نمی‌توان به‌طور کامل رد کرد. همچنین حفظ بلوک‌های سیستمی ممکن است نشان‌دهنده سطحی از حفاظت تکاملی این ژن‌ها پس از واگرایی دو گونه

(Czechowski, 2005; Kozera and Rapacz, 2013). مطالعات متعددی پایداری بیان ژن *18S rRNA* را در شرایط مختلف تنش و در اندام‌ها و مراحل رشدی گوناگون تأیید کرده‌اند. به‌عنوان مثال، جاین و همکاران (Jain et al., 2006) نشان دادند که ژن *18S rRNA* در تیمارهای هورمونی، تنش شوری و تنش خشکی، دارای بیان پایدار بوده و می‌تواند به‌عنوان ژن مرجع مناسب در مرحله گیاهچه و همچنین در مراحل مختلف رشد و اندام‌های متفاوت شامل ساقه، ریشه، برگ، راکیس، گل آذین، گل و بذر مورد استفاده قرار گیرد. همچنین، نتایج گائو و همکاران (Guo et al., 2014) پایداری بالای بیان *18S rRNA* را تحت تنش شوری و خشکی گزارش کرده و استفاده از این ژن را برای نرمال‌سازی داده‌های qRT-PCR در شرایط تنش غیرزیستی تأیید نموده‌اند. علاوه بر این، نیکوت و همکاران (Nicot et al., 2005) نیز نشان دادند که بیان ژن *18S rRNA* تحت تنش‌های شوری و سرما از ثبات بالایی برخوردار است و این ژن یکی از گزینه‌های قابل اعتماد برای ژن مرجع در مطالعات بیان ژن محسوب می‌شود؛ بنابراین، با توجه به گزارش‌های متعدد مبنی بر پایداری بیان ژن *18S rRNA* در تنش‌های غیرزیستی مختلف و در اندام‌ها و مراحل رشدی متفاوت، استفاده از این ژن به‌عنوان ژن مرجع در مطالعه حاضر انتخاب گردید.

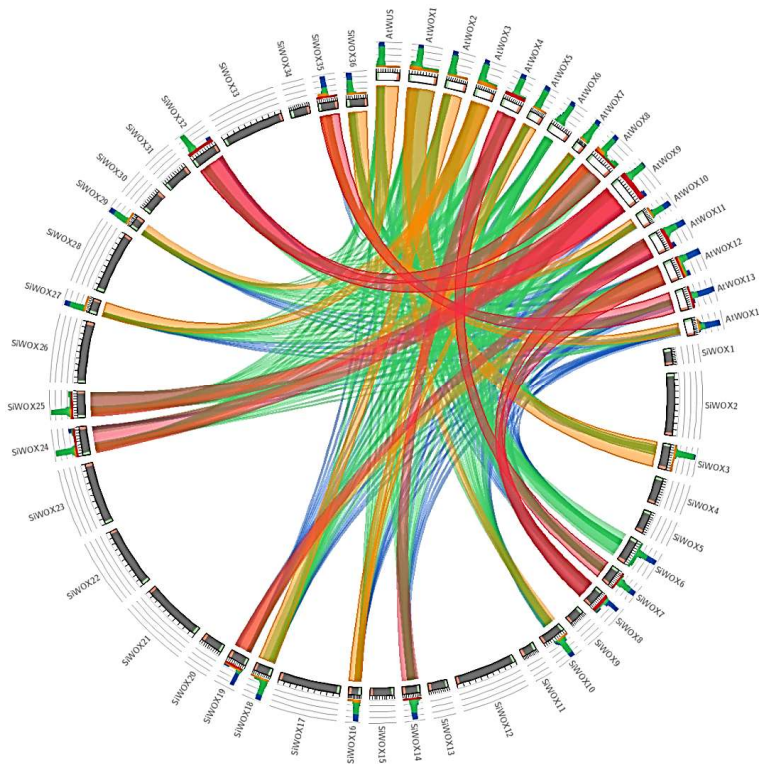
این نتایج در چارچوب یافته‌های پیشین خانواده ژنی *WOX* در گیاه مدل *Arabidopsis thaliana* و سایر گونه‌ها قابل فهم‌تر است. خانواده ژنی *WOX* در این گیاه که شامل ۳۶ عضو است، به سه شاخه قدیمی (باستانی)، میانی و جدید (*WUS*) تقسیم می‌شود که هر کدام نقش‌های مشخصی در رشد، نمو و پاسخ به تنش‌ها دارند (Sarkar et al., 2007; Ikeuchi et al., 2022; Cao et al., 2023). شاخه *WUS*، که ژن *WUS* عضو اصلی آن است، به‌عنوان تنظیم‌کننده حیاتی و محافظت‌شده برای حفظ مرستم رأسی ساقه و توسعه اندام‌های زایشی شناخته می‌شود (Lin et al., 2013; Sarkar et al., 2007). یافته‌های مطالعه حاضر مبنی بر القای قوی *SiWOX36* (که در گروه‌بندی فیلوژنتیکی با ژن *AtWUS* در یک شاخه قرار گرفته است)، در ژنوتیپ سرداری و سرکوب آن در دشتستان، نقش مهم این ژن را در حفظ تعادل سلول‌های

بیان بسیار چشمگیرتر بود؛ به‌طوری‌که به ۶۳۴ برابر در ۲۴ ساعت و سپس به ۲۲/۹۸ برابر در ۴۸ ساعت نسبت به شرایط بهینه رسید. این جهش قابل توجه در بیان ژن، احتمالاً نشان‌دهنده نقش کلیدی *SiWOX16* در مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط با رشد یا بازآرایی بافت‌ها در شرایط تنش‌زا است، زیرا ژن‌های خانواده *WOX* معمولاً با تقسیم سلولی و تنظیم رشد بافت‌های مرستمی در ارتباط‌اند. ژن *SiWOX36* نیز در ژنوتیپ سرداری افزایش تدریجی مشابهی داشت و مقدار آن بیش از ۲/۳۳ برابر در ۴۸ ساعت نسبت به نمونه شاهد رسید که بیانگر مشارکت این ژن در فرآیندهای پاسخ تطبیقی به شرایط محیطی است. در مقابل، در ژنوتیپ دشتستان، الگوی بیان تفاوت محسوسی داشت. مقدار بیان ژن *SiWOX9* در ابتدا (۲۴ ساعت بعد از تیمار) اندکی کاهش یافت اما در ۴۸ ساعت مجدداً افزایش یافته و به ۱/۹۴ برابر نسبت به نمونه شاهد رسید، که نشان می‌دهد این ژن در مراحل اولیه واکنش خفیفی داشته اما در مراحل بعدی به تدریج در پاسخ به محرک‌های محیطی فعال‌تر شده است. در مورد ژن *SiWOX16*، بیان در ۴۸ ساعت کاهش یافت که بیانگر فعالیت کمتر این ژن در مسیرهای تنظیمی ژنوتیپ دشتستان است. بیان ژن *SiWOX36* نیز روندی مشابه نشان داد و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش کاهش یافت. این تغییرات بیان ژن مذکور در دشتستان می‌تواند نشان‌دهنده پاسخ ملایم‌تر و با شدت کمتر به تنش باشد که ممکن است ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی در سازوکارهای تنظیمی یا توانایی‌های فیزیولوژیکی این ژنوتیپ در مقابله با شرایط نامطلوب باشد. به‌طور کلی، الگوهای مشاهده‌شده بیانگر آن است که ژنوتیپ سرداری دارای پاسخ فعال‌تر و افزایش قابل توجه در بیان ژن‌های *SiWOX*، به‌ویژه *SiWOX16* است که ممکن است با تحمل بیشتر به تنش و عملکرد بهتر آن در شرایط دشوار محیطی مرتبط باشد. در حالی که در ژنوتیپ دشتستان، بیان ژن‌ها نوسان ملایمی داشت که می‌تواند با حساسیت بیشتر این ژنوتیپ به تنش‌های محیطی مرتبط باشد (شکل ۷).

برخی از پرکاربردترین و متداول‌ترین ژن‌های خانه‌دار که به‌عنوان کنترل داخلی استفاده می‌شوند شامل گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز (*GAPDH*)، (*Elongation factor-1a*)، پلی‌یوبی کوئینین (*UBQ*)، اکینین، آلفا-توبولین، بتا-توبولین، *18S rRNA*، *25S rRNA* و عوامل رونویسی یوکاریوتی هستند

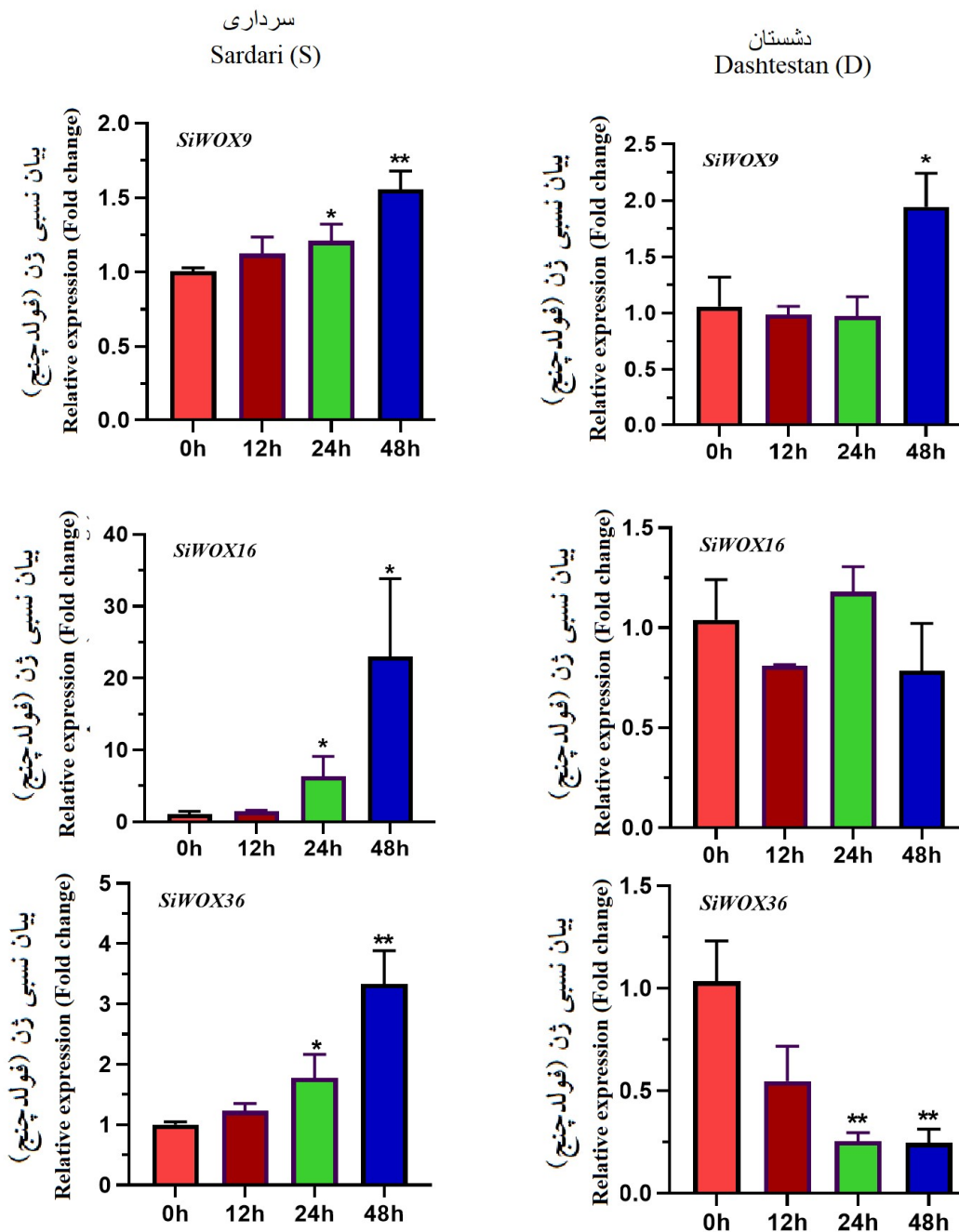
(Sarkar et al., 2007; Dolzblasz et al., 2016). بنیادی و تنظیم رشد تحت تنش تأیید می‌کند (Sarkar et al., 2007; Dolzblasz et al., 2016). در *Arabidopsis* ژن *AtWUS* به‌عنوان یک تنظیم‌کننده سلول‌های بنیادی، در سلول‌های مرکز سازمان‌دهنده در مریستم انتهایی ساقه بیان می‌شود و رشد گیاه و نگهداری سلول‌های بنیادی ساقه را تنظیم می‌کند (Ma et al., 2019; Jha et al., 2020). بیان بیش‌ازحد نابجای ژن‌های *WUS* باعث رفع تمایز سلول‌ها در مریستم ساقه، تشکیل جنین سوماتیک، ایجاد ساقه‌های نابجا و تشکیل برگ‌های جانبی می‌شود (Gallois et al., 2004; Jha et al., 2020). پروتئین‌های *WUSCHEL*-related homeobox همچنین با سرکوب بیان متیل‌ترانسفرازهای وابسته به *S*-آدنوزیل-L-متیونین، گیاه را، به‌ویژه با حفاظت از سلول‌های بنیادی گیاه در برابر تهاجم ویروس در برابر عفونت‌های ویروسی محافظت می‌کنند (Wu

et al., 2020). ارتولوگ‌های *WUS* در گونه‌هایی مانند *Antirrhinum* (ROA) و *Medicago* (HDL) نیز عملکرد مشابهی در حفظ تعادل سلول‌های بنیادی دارند؛ گرچه HDL در یونجه نقشی افزوده در تنظیم رشد پهنک برگ ایفا می‌کند (Lin et al., 2013; Yoshikawa et al., 2016). همچنین، ارتولوگ‌های *WOX9* در گونه‌هایی مانند *Petunia*، *Medicago* و *Nicotiana* در رشد جانبی پهنک برگ و توسعه اندام‌های زایشی نقش دارند که این عملکرد از طریق حفظ تعادل هورمونی انجام می‌شود (Lin et al., 2013; Yoshikawa et al., 2016). القای دیر هنگام *SiWOX9* در هر دو ژنوتیپ، با شدت بیشتر در دشتستان، می‌تواند به عنوان سازوکاری برای جبران آسیب‌های ناشی از خشکی تعبیر شود، در حالی که القای تدریجی و پایدار آن در سرداری با توانمندی ذاتی این ژنوتیپ در مقابله با تنش سازگار است.



شکل ۶- تحلیل Synteny خانواده ژنی *WOX* بین کنجد و *Arabidopsis thaliana* را نشان می‌دهد که در آن مضاعف‌شدگی‌های بخشی مضاعف‌شدگی‌های بی درپی، خوشه‌های ژنی و روابط ارتولوگ میان ژن‌ها با رنگ‌های مختلف مشخص شده‌اند. رنگ‌بندی در نمودار دایره‌ای بر اساس درصد شباهت توالی‌ها تعیین شد؛ به‌طوری‌که رنگ آبی نشان‌دهنده شباهت کمتر از ۵۰ درصد، سبز کمتر از ۷۵ درصد، نارنجی کمتر از ۹۹ درصد و قرمز بیانگر شباهت‌های بالاتر است.

Figure 6. Synteny analysis of the *WOX* gene family between sesame and *Arabidopsis thaliana*, in which segmental duplications, tandem duplications, gene clusters, and orthologous relationships among genes are indicated with different colors. The color scheme in the circos plot is based on sequence similarity, with blue representing less than 50% similarity, green less than 75%, orange less than 99%, and red indicating higher similarity.



شکل ۷- الگوی بیان سه ژن *SiWOX36* و *SiWOX16*، *SiWOX9* در دو ژنوتیپ کنجد سرداری (S) و دشتستان (D) تحت تنش خشکی القاشده با استفاده از پلی اتیلن گلیکول 6000. ارور بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد میانگین (SE) بر اساس سه تکرار زیستی هستند. علامت‌های ستاره بیانگر اختلاف آماری معنی‌دار نسبت به تیمار شاهد می‌باشند (* $P < 0.05$ ، ** $P < 0.01$).

Figure 7. Expression patterns of three genes, *SiWOX9*, *SiWOX16*, and *SiWOX36*, in two sesame genotypes, Sardari (S) and Dashtestan (D), under drought stress induced by polyethylene glycol (PEG 6000). Error bars represent the standard error of the mean (SE) based on three biological replicates. Asterisks indicate statistically significant differences compared with the control treatment (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

محیطی ایفا کند. شناسایی ۳۶ ژن *SiWOX*، توزیع نامتقارن آن‌ها بر روی کروموزوم‌ها و وجود دمین‌های حفاظت‌شده از نوع Homeodomain بیانگر اهمیت تکاملی این خانواده در حفظ عملکردهای اساسی سلولی است. بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نشان داد که بیشتر پروتئین‌ها دارای ماهیت آبدوست و پایداری ساختاری بالا هستند و عمدتاً در هسته قرار دارند، که با نقش آن‌ها در تنظیم رونویسی ژن‌ها سازگار است. همچنین، تنوع عناصر سیس در ناحیه پرموتری این ژن‌ها نشان‌دهنده امکان مشارکت آن‌ها در پاسخ به محرک‌های نوری، هورمونی و تنش‌های محیطی بوده و حاکی از پیچیدگی احتمالی در تنظیم بیان آن‌هاست. تحلیل بیان ژن‌های *SiWOX9*، *SiWOX16* و *SiWOX36* در دو ژنوتیپ سرداری و دشتستان نشان داد که پاسخ ژنتیکی به تنش در این دو ژنوتیپ متفاوت است. الگوهای بیان متفاوت تحت تنش خشکی در ژنوتیپ‌های سرداری و دشتستان، به‌ویژه القای *SiWOX16* و افزایش بیان *SiWOX9* و *SiWOX36* در سرداری، نقش احتمالی آن‌ها را در تحمل به خشکی نشان می‌دهد. با این حال، مطالعات عمیق‌تر با استفاده از داده‌های RNA-seq و در بافت‌های مختلف گیاهی و نیز اعمال تنش در مراحل فنولوژیک دیگر گیاه برای روشن شدن بهتر سهم این خانواده ژنی در تحمل به خشکی کنجد مورد نیاز است.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی و دفتر برنامه امنیت غذایی موسسه آموزشی تحقیقاتی صنایع دفاعی به جهت حمایت مالی و همکاری در اجرا پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

از سوی دیگر، افزایش بیان ژن *SiWOX16* در ژنوتیپ سرداری، به ویژه در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از شروع تنش، بیانگر نقش کلیدی این ژن از شاخه باستانی خانواده ژنی *WOX* در مسیرهای سیگنالینگ و حفاظت سلولی است؛ موضوعی که در مطالعات پیشین در رشد ریشه، گلدهی، تشکیل کالوس و تحمل به خشکی نیز گزارش شده است (Ikeuchi et al., 2022; Cao et al., 2023). مطالعات مکانی-زمانی بیان ژن‌های خانواده *WOX* نیز نشان داده‌اند که این ژن‌ها علاوه بر حفظ سلول‌های بنیادی و تنظیم رشد، در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی از جمله خشکی نقش دارند و الگوهای بیانی پیچیده و تخصصی آن‌ها، امکان انعطاف‌پذیری بالا در مقابله با شرایط محیطی را فراهم می‌کند (Sarkar et al., 2007; Ueda et al., 2011; Lv et al., 2023). قابلیت جایگزینی عملکردی اعضای شاخه *WUS*، از جمله توانایی جبران جهش‌های *wox5* یا *wus* در آراییدوپسیس، نشان‌دهنده اهمیت کنترل دقیق زمانی و مکانی بیان این ژن‌ها است (Sarkar et al., 2007; Dolzblasz et al., 2016). در نهایت، نتایج مطالعه حاضر با تأکید بر نقش کلیدی ژن‌های شاخه *WUS* و باستانی خانواده *WOX* در پاسخ به خشکی، اهمیت هماهنگی دقیق الگوی بیانی این ژن‌ها در تعیین سطح تحمل به خشکی را برجسته می‌سازد. این یافته‌ها نه تنها دانش ما را درباره سازوکارهای مولکولی تحمل به خشکی در کنجد افزایش می‌دهند، بلکه می‌توانند راهنمایی برای به‌زودی مولکولی در جهت بهبود مقاومت به تنش‌های محیطی در این گیاه و سایر گیاهان زراعی فراهم آورند. نتایج این پژوهش نشان داد که خانواده ژنی *WOX* در گیاه کنجد دارای تنوع ساختاری و عملکردی قابل توجهی است که می‌تواند نقش مهمی در فرآیندهای رشد و پاسخ به تنش‌های

References

- Bahrami, H., Razmjoo, J. and Jafari, A.O. (2012). Effects of drought stress on germination and seedling growth of sesame cultivars (*Sesamum indicum* L.). *International Journal of Agricultural Science*, 2(5): 423–428.
- Barcelos, E., De Almeida Rios, S., Cunha, R.N.V., Lopes, R., Motoike, S.Y., Babiychuk, E., Skiryecz, A. and Kushnir, S. (2015). Oil palm natural diversity and the potential for yield improvement. *Frontiers in Plant Science*, 6: 190. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00190>
- Burglin, T.R. and Affolter, M. (2016). Homeodomain proteins: an update. *Chromosoma*, 125(3): 497–521. <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0543-8>
- Cao, X., Xie, H., Song, M., Lu, J., Ma, P., Huang, B., Wang, M., Tian, Y., Chen, F. and Peng, J. (2023). Cut-dip-budding delivery system enables genetic modifications in plants without tissue culture. *The Innovation (Cambridge)*, 4(1): 100345. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2022.100345>
- Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H.R., Frank, M. H., He, Y. and Xia, R. (2020). TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 13(8): 1194–1202. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.06.009>

- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K. and Scheible, W. R. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139(1): 5–17. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063743>
- Dolzblass, A., Nardmann, J., Clerici, E., Causier, B., Van der Graaff, E., Chen, J., Davies, B., Werr, W. and Laux, T. (2016). Stem cell regulation by Arabidopsis *WOX* genes. *Molecular Plant*, 9(7): 1028–1039. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.04.007>
- Dossa, K., Niang, M., Assogbadjo, A.E., Cissé, N. and Diouf, D. (2016). Whole genome homology-based identification of candidate genes for drought resistance in *Sesamum indicum* L. *African Journal of Biotechnology*, 15(28): 1464–1475. <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15420>
- Fahmideh, L., Delarampoor, M.A. and Fooladvand, Z. (2025). Study of MYB transcription factor gene expression in some bread wheat cultivars of Sistan region, Iran. *Plant Genetic Research*, 7(1): 181-196 (In Persian). <http://doi: 20.1001.1.23831367.1399.7.1.6.3>
- Gallois, J.L., Nora, F.R., Mizukami, Y. and Sablowski, R. (2004). WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. *Genes and Development*, 18(4): 375–380. <https://doi.org/10.1101/gad.291204>
- Guo, J., Ling, H., Wu, Q., Xu, L. and Que, Y. (2014). The choice of reference genes for assessing gene expression in sugarcane under salinity and drought stresses. *Scientific Reports*, 4: 7042. <https://doi.org/10.1038/srep07042>
- Haecker, A., Gross-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M. and Laux, T. (2004). Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131(3): 657–668. <https://doi.org/10.1242/dev.00963>
- Hao, Q., Zhang, L., Yang, Y., Shan, Z. and Zhou, X.A. (2019). Genome-wide analysis of the *WOX* gene family and function exploration of GmWOX18 in soybean. *Plants*, 8(7): 215. <https://doi.org/10.3390/plants8070215>
- Hassanzadeh, M., Abdollahi Mandoulakani, B. and Mahmoodian, Z. (2025). Assessment of the relative expression of the transcription factors bHLH94, bZIP33 and WRKY46 in bread wheat cultivars under iron deficiency conditions. *Plant Genetic Research*, 12(1): 91-104 (In Persian). <http://doi: 10.22034/pgr.2025.2069008.1012>
- Hassanzadeh, M., Asghari, A., Jamaati-e-Somarin, S.H., Saeidi, M., Zabihi-e-Mahmoodabad, R. and Hokmalipour, S. (2009). Effects of water deficit on drought tolerance indices of sesame (*Sesamum indicum* L.) genotypes in Moghan region. *Research Journal of Environmental Sciences*, 3(3): 116–121. <https://doi.org/10.3923/rjes.2009.116.121>
- Holland, P.W.H. (2013). Evolution of homeobox genes. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, 2(1): 31–45. <https://doi.org/10.1002/wdev.78>
- Ikeuchi, M., Iwase, A., Ito, T., Tanaka, H., Favero, D. S., Kawamura, A., Sakamoto, S., Wakazaki, M., Tameshige, T., Fujii, H. and Laux, T. (2022). Wound-inducible WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 13 is required for callus growth and organ reconnection. *Plant Physiology*, 188(1): 425–441. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab510>
- Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A. K. and Khurana, J.P. (2006). Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(2): 646–651. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.140>
- Jatav, K.S., Agarwal, R.M., Singh, R.P. and Shrivastava, M. (2021). Growth and yield responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) to suboptimal water supply and different potassium doses. *Journal of Functional and Environmental Botany*, 2: 39–51.
- Jha, P., Ochatt, S.J. and Kumar, V. (2020). WUSCHEL: A master regulator in plant growth signaling. *Plant Cell Reports*, 39(4): 431–444. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02511-5>
- Kozera, B. and Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, 54(4): 391–406. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lian, G., Ding, Z., Wang, Q., Zhang, D. and Xu, J. (2014). Origins and evolution of WUSCHEL-related homeobox protein family in plant kingdom. *The Scientific World Journal*, 2014: 534140. <https://doi.org/10.1155/2014/534140>
- Lin, H., Niu, L., McHale, N.A., Ohme-Takagi, M., Mysore, K.S. and Tadege, M. (2013). Evolutionarily conserved repressive activity of *WOX* proteins mediates leaf blade outgrowth and floral organ development in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(1): 366–371. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215376110>
- Lv, J., Feng, Y., Jiang, L., Zhang, G., Wu, T., Zhang, X., Xu, X., Wang, Y. and Han, Z. (2023). Genome-wide identification of *WOX* family members in nine Rosaceae species and a functional analysis of MdWOX13-1 in drought resistance. *Plant Science*, 328: 111564. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111564>
- Ma, Y., Miotk, A. and Šutiković, Z. (2019). WUSCHEL acts as an auxin response rheostat to maintain apical stem cells in Arabidopsis. *Nature Communications*, 10: 5093. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13074-9>
- Mukherjee, K., Brocchieri, L. and Bürglin, T.R. (2009). A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes. *Molecular Biology and Evolution*, 26(12): 2775–2794. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp201>
- Nicot, N., Hausman, J. F., Hoffmann, L. and Evers, D. (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 56(421): 2907–2914. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri285>

- Oboulbiga, E.B., Douamba, Z., Compaoré-Séréme, D., Semporé, J.N., Dabo, R. and Semde, Z. (2023). Physicochemical, potential nutritional, antioxidant and health properties of sesame seed oil: a review. *Frontiers in Nutrition*, 10: 1127926. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1127926>
- Ozkan, A. and Kulak, M. (2013). Effects of water stress on growth, oil yield, fatty acid composition, and mineral content of *Sesamum indicum*. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 23(6): 1686–1690.
- Padyab, S., Asghari Zakaria, R., Zare, N., Hosseinpour, N., Zaeifzadeh, M. and Sheikhzadeh, P. (2025). Evaluation of sesame (*Sesamum indicum* L.) genotypes' response to drought stress. *Environmental Stresses in Crop Sciences* (In Press).
- Pathak, N., Rai, A.K., Kumari, R., Thapa, A. and Bhat, K.V. (2014). Sesame crop: an underexploited oilseed holds tremendous potential for enhanced food value. *Agricultural Sciences*, 5(6): 519–529. <https://doi.org/10.4236/as.2014.56054>
- Sarkar, A.K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R. and Laux, T. (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature*, 446(7137): 811–814. <https://doi.org/10.1038/nature05703>
- Sun, J., Rao, Y., Le, M., Yan, T., Yan, X. and Zhou, H. (2010). Effects of drought stress on sesame growth and yield characteristics and comprehensive evaluation of drought tolerance. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 32(4): 525–533.
- Ueda, M., Zhang, Z. and Laux, T. (2011). Transcriptional activation of *Arabidopsis* axis patterning genes *WOX8/9* links zygote polarity to embryo development. *Developmental Cell*, 20(2): 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.01.009>
- Van der Graaff, E., Laux, T. and Rensing, S.A. (2009). The WUS homeobox-containing (*WOX*) protein family. *Genome Biology*, 10: 248. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-12-248>
- Vollbrecht, E., Veit, B., Sinha, N. and Hake, S. (1991). The developmental gene *Knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family. *Nature*, 350(6315): 241–243. <https://doi.org/10.1038/350241a0>
- Wang, L., Yu, J., Li, D. and Zhang, X. (2015). Sinbase: An integrated database to study genomics, genetics and comparative genomics in *Sesamum indicum*. *Plant and Cell Physiology*, 56(11): e2. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu175>
- Wu, C.C., Li, F. W. and Kramer, E.M. (2019). Large-scale phylogenomic analysis suggests three ancient superclades of the WUSCHEL-related homeobox transcription factor family in plants. *PLoS One*, 14(10): e0223521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223521>
- Wu, H., Qu, X., Dong, Z., Luo, L., Shao, C., Former, J., Lohmann, J. U., Su, M., Xu, M., Liu, X., Zhu, L., Zeng, J., Liu, S., Tian, Z. and Zhao, Z. (2020). WUSCHEL triggers innate antiviral immunity in plant stem cells. *Science*, 370(6513): 227–231. <https://doi.org/10.1126/science.abb7360>
- Yoshikawa, T., Tanaka, S. Y., Masumoto, Y., Nobori, N., Ishii, H., Hibara, K., Itoh, J., Tanisaka, T. and Taketa, S. (2016). Barley *NARROW LEAFED DWARF1* encoding a WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 3 (*WOX3*) regulates the marginal development of lateral organs. *Breeding Science*, 66(3): 416–424. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.16019>
- Zabet, M., Barazandeh, F. and Samadzadeh, A. (2023). Evaluation of genetic structure of yield and its components in sesame using Hayman's numerical and graphical analysis in Birjand's climate conditions. *Plant Genetic Research*, 10(1): 123-144 (In Persian). <http://dx.doi.org/10.22034/pgr.10.1.8>
- Zhang, X., Zong, J., Liu, J., Yin, J. and Zhang, D. (2010). Genome-wide analysis of *WOX* gene family in rice, sorghum, maize, *Arabidopsis* and poplar. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(11): 1016–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00982.x>