مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۳، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹
ISSN 2716-9804الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

کاوش پاسخ‌های دفاعی گیاه به بیمارگرها به کمک فناوری RNA-seq

فاطمه خلقتی‌بناء*[۱]، احمد سبحانی نجف‌آبادی[۲] و کبری مسلم‌خانی[۳]

۱- دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، آزمایشگاه گیاه‌پزشکی، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران

۲- دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران شاخه اصفهان، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، اصفهان، ایران

۳-دانشیار، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران

khelghati50@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۸/۱۲، تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۲۹

صفحه ۱۱۰-۸۷

چکیده

گیاهان برخلاف جانوران، سلول‌های دفاعی متحرک نداشته و سیستم دفاعی آنها به‌طور طبیعی قابلیت توسعه و سازگاری در برابر بیمارگرها را ندارد. سیستم ایمنی ذاتی گیاهان بسیار پیچیده و در دو لایه مهم سازمان‌یافته و به سیستم پیام‌رسانی گسترده وابسته است. هر لایه از این سیستم از اجزاء متعددی تشکیل شده که هر یک در زمان مناسب وارد عمل می‌شوند. سدهای دفاعی شیمیایی و فیزیکی که از ورود بیمارگر و بروز آلودگی جلوگیری می‌کنند، انفجار اکسیژنی، بیان پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی و مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده، همه بخش‌هایی از این سیستم پیچیده هستند. یکی از بهترین راه‌های مطالعه پاسخ‌های دفاعی گیاه به بیمارگر مطالعه الگوی تغییرات بیان ژن در گیاه بیمار نسبت به گیاه سالم در سطح ترانسکریپتوم است. با توالی‌یابی مولکول‌های mRNA در سلول و شناسایی ژن‌های مربوط به این مولکول‌ها می‌توان به الگوی تغییرات بیان ژن‌ها و میزان این تغییرات پس از بروز بیماری پی برد. فناوری پُربروندادِ (High-Through put Technologies) RNA-seq با بهره‌گیری از توانمندی‌های توالی‌یابی نسل دوم، امکان شناسایی و کمی‌سازی صدها ژن را در ترانسکریپتوم فراهم می‌کند. این فناوری امروزه به‌عنوان یکی از بهترین ابزارهای مطالعه ترانسکریپتوم برهمکنشی میزبان-بیمارگر و شناسایی ژن‌های درگیر در پاسخ‌های دفاعی گیاهان شناخته می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سیستم ایمنی گیاه، برهمکنش گیاه/ بیمارگر، توالی‌یابی آر.ان.اِ، خوانش‌های دوطرفه، آنالیز ژن‌های دارای بیان افتراقی.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

مقدمه

گیاهان به‌دلیل ثابت ماندن در یک محل و ناتوانی در جابجایی و تغییر شرایط محیطی خود، دارای مسیرهای پیام‌رسانی بسیار مفصل و پر از جزییات هستند تا بتوانند با حفظ هماهنگی در هزینه‌های انرژی مورد نیاز برای رشد، از خود در برابر انواع تنش‌های زنده و غیرزنده خارجی دفاع کنند (۳). افزون‌بر این، تکامل همراه و همزمان (coevolution) گیاهان با انواع بیمارگرهای گیاهی سبب تشکیل یک سیستم ایمنی ذاتی بسیار پیچیده و لایه‌ای در آنها شده که دارای اجزاء پرشماری است. سدهای دفاعی شیمیایی و فیزیکی که از ورود بیمارگر و بروز آلودگی پیشگیری می‌کنند (۴)، تا مکانیسم‌های دفاعی القایی مانند انفجار اکسیژنی (oxidative burst)، بیان پروتئین‌های PR (pathogenesis related proteins) و مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده(programmed cell death) که به دنبال شناسایی بیمارگر آغاز می‌شوند (۵)، همگی بخش‌هایی از این سیستم ایمنی هستند. مطالعه الگوی تغییرات بیان ژن در گیاه بیمار نسبت به گیاه سالم، شناسایی اجزاء دخیل در سیستم ایمنی را امکان‌پذیر می‌سازد. تظاهر و بیان هر ژن در موجودات زنده با رونوشت‌برداری از روی آن و ساخت رونوشت آر.ان.اِ یا رونوشت آن ژن آغاز می‌شود. به آر.ان.اِ کل موجود در سلول ترانسکریپتوم اطلاق می‌شود. ترانسکریپتوم از دو بخش مهم به نام مجموعه mRNAهای کدکننده پروتئین و مجموعه مولکول‌های آر.ان.اِ غیرکدکننده تشکیل شده است. از زمان معرفی مولکول‌های آر.ان.اِ به‌عنوان عوامل حدواسط بین ژنوم و پروتئوم، شناسایی رونوشت‌ها و کمی‌سازی بیان آنها یکی از زمینه‌های اصلی در زیست‌شناسی مولکولی بوده است (۶). با توالی‌یابی مولکول‌های mRNA در سلول و شناسایی ژن‌های مربوط به این مولکول‌ها می‌توان به الگوی تغییرات بیان ژن‌ها و میزان این تغییرات در یک زمان خاص یا پس از ایجاد یک شرایط ویژه مانند بیماری، پی برد. افزون‌بر این توالی‌یابی آر.ان.اِ کل نیز می‌تواند با ارائه الگویی جامع از انواع رونوشت‌های موجود در سلول شامل رونوشت‌های کدکننده و غیرکدکننده، ما را در درک عملکرد و

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

سازماندهی ژنوم یاری کند. توالی‌یابی ترانسکریپتوم ویژه برای موجودات غیرمدل که بانک اطلاعات ژنتیکی برای آنها موجود نبوده یا ناقص است، بسیار مهم بوده و اطلاعات به دست آمده از این روش می‌تواند تا حدی نبود توالی ژنوم کامل را جبران کند (۷). مولکول‌های آر.ان.اِ پیش از توالی‌یابی نخست باید به رونوشت دی.ان.ای خود (cDNA) تبدیل شوند. گرچه پلتفرم‌های مختلفی برای توالی‌یابی آر.ان.اِ ساخته و معرفی شده است اما در سال‌های اخیر بیشتر از پلتفرم ائلومنا (Illumina) به علت هزینه کمتر و توانایی بیشتردر تولید داده، استفاده شده است (۸). نتیجه توالی‌یابی مولکول‌های آر.ان.اِ در پلتفرم ائلومنا به‌صورت خوانش‌های کوتاه (Short reads) یک طرفه (single end, SE) یا دوطرفه (paired end, PE) به طول حداکثر ۱۵۰bp گزارش می‌شود. توالی‌یابی مولکول‌های آر.ان.اِ نخست برای مطالعه ترانسکریپتوم انسان مورد استفاده قرار گرفت (۹). کاربرد فناوری RNA-seq در پزشکی با ردیابی و شناسایی به موقع و سریع رونوشت‌ها یا ژن‌های بهم چسبیده که یکی از دلایل اصلی رشد سرطانی سلول‌ها به‌شمار می‌روند، نقشی حیاتی در شناسایی زودهنگام و انجام اقدامات به‌موقع ومناسب درمانی دارد. در سال‌های اخیر فناوری RNA-seq به‌دلیل فراهم کردن امکان مطالعه الگوی تغییرات همزمان صدها ژن در ترانسکریپتوم به‌طور همزمان در میزبان و بیمارگر، به‌عنوان یکی از بهترین ابزارهای مطالعه ترانسکریپتوم برهمکنشی میزبان-بیمارگر و شناسایی ژن‌های درگیر در پاسخ‌های دفاعی گیاهان شناخته می‌شود.

کاربرد توالی‌یابی آر.ان.اِ در شناسایی ژن‌ها و تغییرات بیان آنها

تاکنون اطلاعات بسیار ارزشمندی از ژن‌ها و ساختار آنها به کمک روش‌های قدیمی‌تر مطالعه ترانسکریپتوم مانند همسانه‌سازی ژن‌ها یا قطعات ژنی، توالی‌یابی cDNA با روش سنگر، آنالیزهای بیانی ریزآرایه و SAGE (serial analysis of gene expression) به دست آمده که در پایگاه‌های داده نگهداری می‌شوند. تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-seq با مکان‌یابی (mapping) خوانش‌های کوتاه با توالی‌های

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

موجود در این پایگاه‌ها آغاز می‌شود. پس از مکان‌یابی خوانش‌ها با توالی ژن‌های شناخته شده، ژن‌های بیان‌شده در ترانسکریپتوم شناسایی می‌شود. علاوه‌بر این توالی‌یابی آر.ان.اِ به‌دلیل داشتن ماهیت کمی، توانایی کشف اگزون‌های بیشتر بیان‌شده یا اگزون‌های جایگزین بیان‌شده را فراهم می‌آورد.

توالی‌یابی آر.ان.اِ با تولید میلیون‌ها خوانش، قادر است علاوه‌بر شناسایی ژن‌های شناخته شده در ترانسکریپتوم، امکان شناسایی ژن‌های جدید در مکان‌هایی از رونوشت را که در آنها هیچ ژنی قبلا پیش‌بینی یا شناسایی نشده است، را فراهم آورد. تولید شکل‌های جدید یک ژن یا ایزوفرم‌ها (isoforms) یکی از مکانیسم‌های اصلی در ایجاد تغییرات ترانسکریپتومی، است (۱۰). در این فرآیند بیولوژیکی اگزون‌های ویژه از یک ژن ممکن است از mRNA حذف یا به آن اضافه شوند. ایزوفرم‌ها به پروتئین‌های یکسانی از نظر عملکرد، ترجمه می‌شوند که ممکن است در پاسخ اختصاصی یک موجود به شرایط متفاوت بیان شوند. شواهد به‌دست آمده از مطالعات اخیر پیشنهاد می‌کند که بیش از ۹۰٪ ژن‌های چند اگزونی در انسان و ۶۱٪ از ژن‌های دارای اینترون در گیاهان، دچار این نوع تغییرات می‌شوند (۱۱، ۱۲). با انجام آنالیزهای ویژه، این دسته از ژن‌ها را نیز می‌توان به کمک فناوری RNA-seq شناسایی کرد. تجزیه و تحلیل ایزوفرم‌های بیان‌شده که در شرایط متفاوت مورد استفاده سلول قرار گرفته‌اند، آنالیز بیان افتراقی ژن‌ها را که در اثر تغییر در تنظیم بیان ژن رخ داده است، تکمیل می‌کند.

مراحل آنالیز RNA-seq

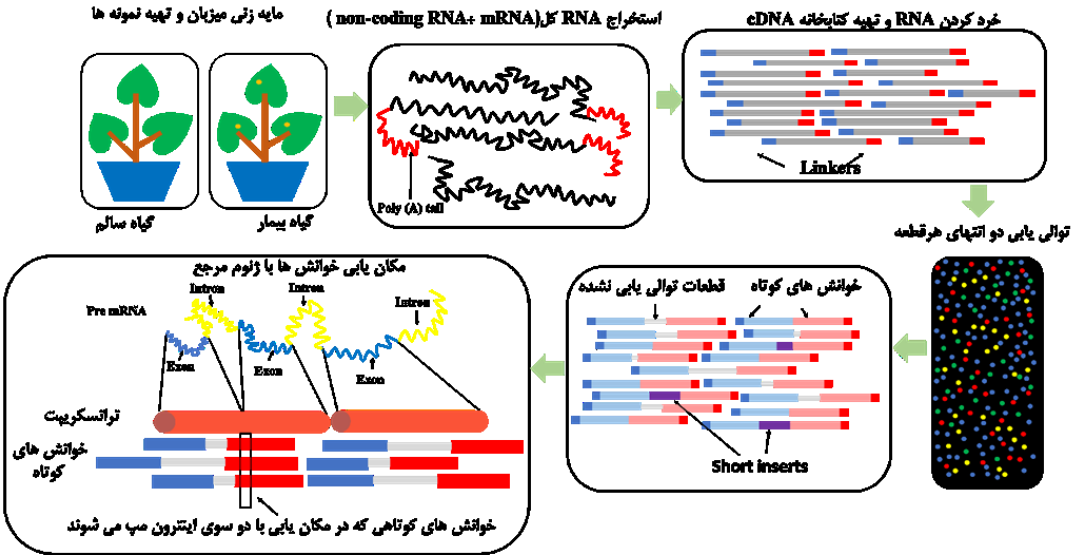
تهیه نمونه‌ها، استخراج آر.ان.اِ، تهیه کتابخانه cDNA، توالی‌یابی و تولید خوانش‌ها.

توالی‌یابی ترانسکریپتوم مورد مطالعه با استخراج آر.ان.اِ کل از نمونه‌های مورد پژوهش آغاز می‌شود (شکل ۱). نمونه‌ها به دو گروه شاهد و تیمار (بیمار، یک مرحله تمایزی خاص) دسته‌بندی شده و پس از استخراج آر.ان.اِ کل از نمونه‌ها، عملیات خرد کردن (fragmentation) مولکول‌های آر.ان.اِ انجام شده و به کمک آنزیم ریورس ترنس‌کریپتاز و فرآیند رونوشت‌برداری

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

معکوس، مجموعه‌ای از صدها هزار مولکول cDNA (cDNA library) تهیه می‌شود. پس از اتصال لینکرها (linkers) یا آداپتورها (adaptors) به دو انتهای قطعات موجود در کتابخانه cDNA، توالی‌یابی این کتابخانه در یکی از پلتفرم‌های ویژه توالی‌یابی نسل دوم (second generation sequencing) -بیشتر ائلومنا- انجام شده و نتیجه این توالی‌یابی به‌صورت خوانش‌های کوتاه (short reads) از ماشین توالی‌یابی به دست می‌آید. نتیجه این فرآیند تولید میلیون‌ها خوانش کوتاه (بین ۳۰ تا ۱۰۰ میلیون خوانش یا ۳ تا ۱۰ گیگابایت داده) در هر نمونه آر.ان.اِ توالی‌یابی شده است.



شکل ۱- مراحل انجام یک آنالیز RNA-seq از تهیه نمونه تا مکان‌یابی خوانش‌ها.

سنجش کیفیت، ویرایش خوانش‌ها

خوانش‌ها در فایل‌های متنی (text files) به فرمت FASTQ ذخیره می‌شوند. به این معنی که علاوه‌بر توالی بازها، کیفیت هر باز نیز بر مبنای امتیاز کیفیت فرِد (phred quality score) در آن ذخیره شده است. امتیاز کیفیت فرِد بر اساس کد مربوط به هر کاراکتر در جدول اَس کی (ASCII table) نشان داده می‌شود. پلتفرم ائلومنا در سال‌های اخیر از آفست ۳۳ برای نمایش کیفیت ۱۰ در امتیاز کیفیت فرِد استفاده می کند. بر این مبنا، کاراکتر"!"

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

(decimal value برابر ۳۳ در جدول ASCII)، بیانگر امتیاز کیفیت فرِد برابر ۱۰ و کاراکتر"@" (decimal value برابر ۶۴ در جدول ASCII) بیانگر امتیاز کیفیت فرِد برابر ۴۰ است. امتیاز کیفیت فرِد با معادله $Qphred=-10\ log_{10}(p)$ تعریف می‌شود که در آن p عبارت است از احتمال اشتباه خوانده شدن هر باز. بنابراین وقتی امتیاز Qphered برابر ۲۰ است به این معنی است که از هر ۱۰۰ باز خوانده شده، یک باز، اشتباه توالی‌یابی شده است و به عبارت دیگر احتمال درستی توالی‌یابی برای هر باز در Qphred 20، ۹۹٪ است (۱۳). نرم‌افزارهای مختلفی برای سنجش کیفیت داده‌ها معرفی شده است. نرم‌افزار FastQC در سیستم‌عامل لینوکس یکی از بهترین این نرم‌افزارها است. FastQC با چند آزمون مختلف کیفیت خوانش‌ها را ارزیابی می‌کند. آزمون کیفیت توالی خوانده‌شده به ازاء هر باز یا امتیاز Qphered مهمترین این آزمون‌هاست. گزارش FastQC برای هر نمونه به‌صورت تصویر و در فایل‌های HTML ذخیره می‌شود. در این گزارش، دامنه کیفیت خوانش در هر نمونه، بر اساس استاندارد کدگذاری سنجش کیفیت، به‌صورت یک تصویر با سه منطقه سبز، نارنجی و قرمز نمایش داده می‌شود که رنگ سبز بیانگر کیفیت بالا، نارنجی کیفیت متوسط و قرمز کیفیت غیرقابل‌قبول است. استاندارد کدگذاری کیفیت برای پلتفرم ائلومنا مشابه استاندارد مورد استفاده در روش توالی‌یابی سنگر(Sanger sequencing)، یعنی بر مبنای ۱۰ تا ۴۰ است. خوانش‌های بی‌کیفیت و نامطلوب در داده‌های خام در مراحل بعدی آنالیز اثر منفی داشته و باید حذف شوند. این خوانش‌های نامطلوب شامل آداپتورها، خوانش‌هایی که درصد نوکلئوتیدهای خوانده نشده (N) در آنها از ۵۰٪ بیشتر است و سایر خوانش‌هایی که در آزمون کیفیت رد شده‌اند، باید حذف شوند. ازخوانش‌هایی که شاخص کیفیت آنها از ۲۰ بالاتر است، برای آنالیز استفاده می‌شود. برای حذف و برش نوکلئوتیدهای نامناسب از طول خوانش‌ها، نرم‌افزارهای مختلفی وجود دارد که تریموماتیک (trimmomatic) در سیستم عامل لینوکس یکی از این نرم‌افزارها بوده و برای

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

خوانش‌های دوطرفه ائلومنا مناسب است (۱۴).

هم‌ردیفی و مکان‌یابی خوانش‌ها روی ژنوم مرجع

آنالیز داده‌های RNA-seq با مکان‌یابی خوانش‌ها (mapping) روی ژنوم مرجع آغاز می‌شود که نتیجه آن دسته‌بندی و شناسایی خوانش‌هاست (شکل ۲). هر مجموعه از خوانش‌ها با یک یا چند ژن با درجاتی از هم‌ردیفی ارتباط دارند. شناسایی این دسته‌ها و تعیین موقعیت آنها روی ژنوم در مراحل بعدی، امکان بازسازی مجموعه‌ای کامل از رونوشت‌ها وایزوفرم‌ها و تعیین موقعیت آنها را فراهم می‌آورد. نرم‌افزارهای Bowtie (۱۵) و BWA (Burrows-Wheeler aligner) (۱۶) تاکنون بیشترین کاربرد را داشته‌اند. هر دو الگوریتم از ساختار داده‌ای به نام BWT (Burrows-Wheeler transform) استفاده می‌کنند. این ساختار در حقیقت ژنوم مرجع را به شکلی بسیار فشرده ذخیره می‌کند. همچنین این ابزارها از نوع ویژه‌ای از نمایه‌سازی (indexing) به نام نمایه‌سازی FM (Ferragina-Manzini indexing) برای ژنوم مرجع کمک می‌گیرند تا جستجو در ژنوم مرجع با سرعتی بسیار بالا- میلیون‌ها خوانش در هر ساعت- انجام شود (۱۷). ابزارهای مکان‌یابی ویژه RNA-seq با چالش‌های بیشتری نسبت به مکان‌یابی در دی.ان.اِ روبه‌رو هستند. بسیاری از خوانش‌های RNA-seq دست کم با دو اگزون مختلف (در دو سوی اینترون) هم‌ردیف می‌شوند چرا که توالی‌یابی مولکول‌های آر.ان.اِ پس از برش و جداشدن نواحی اینترونی از رونوشت، انجام شده است (شکل ۲). بنابراین یک خوانش از RNA-seq ممکن است با دو اگزون از رونوشت که روی ژنوم مرجع ۱۰۰۰۰bp یا بیشتر، فاصله دارند، هم‌ردیف شود. برای نمونه در یک سری معمولی از خوانش‌های ۱۰۰ جفت بازی RNA-seq از انسان بیشتر از ۳۵٪ خوانش‌ها با چندین اگزون از یک رونوشت هم‌ردیف شده‌اند (۱۸). یافتن هم‌ردیفی برای این خوانش‌های چند اگزونی به مراتب دشوارتر از حالتی است که خوانش‌ها متعلق به یک اگزون باشند. مهمترین ویژگی یک ابزار هم‌ردیف‌یاب،

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

توانایی شناسایی و حساسیت به مکان‌های برش اینترون و اتصال اگزون‌ها (exon junction) در رونوشت است. بر این اساس دو دسته کلی از این ابزارها: هم‌ردیف‌یاب‌های غیرحساس به مکان برش (unspliced aligners) و هم‌ردیف‌یاب‌های حساس به مکان برش(spliced aligners) توسعه داده شده‌اند. HISAT2 از هم‌ردیف‌یاب‌های حساس به مکان برش است. HISAT2 و Bowtie از نمایه‌سازی بر اساس BWT/FM استفاده می‌کنند که شامل یک نمایه‌سازی سراسری و چندین هزار نمایه‌سازی کوچک و پراکنده در ژنوم است. اما HISAT2 هم‌ریف‌سازی را با سرعتی چندین برابر سرعت Bowtie یا BWA انجام می‌دهد (۱۸). علاوه‌بر آن HISAT قادر است مکان‌های جدید برش و مکان‌های جدید شروع و پایان رونوشت‌برداری را شناسایی کند. این نرم‌افزار با فراخوانی فایل حاشیه‌نویسی ژنوم مرجع (genome annotation file) که محدوده اگزون‌ها و اینترون‌های شناخته‌شده در آن مشخص است، عملیات مکان‌یابی خوانش‌ها را بهبود می‌دهد.

مونتاژ خوانش‌ها و بازسازی ترانسکریپتوم

بازسازی رونوشت‌ها و ایزوفرم‌های آنها یکی از مهم‌ترین اهداف در آنالیز RNA-seq است. علاوه‌بر تلاش برای بازسازی درست و کامل هر رونوشت، سطح نسبی بیان هر یک از رونوشت‌ها نیز تخمین زده می‌شود. از آن جا که حتی در مورد گونه‌هایی مانند انسان که پژوهش‌های زیادی روی آن صورت گرفته، هنوز حاشیه نویسی ژن‌های کدکننده پروتئین، واریانت‌های آنها که حاصل از آلترناتیو اسپلایسینگ هستند و ژن‌های آر.ان.ای‌های غیرکدکننده، کامل نشده، نمی‌توان انتظار داشت نتیجه بازسازی ترانسکریپتوم بر مبنای ژنوم مرجع و فایل حاشیه‌نویسی، ما را به فهرست کاملی از تمام ژن‌ها و ایزوفرم‌ها برساند. علاوه‌بر این، برخی نرم‌افزارهای هم‌ردیف‌کننده، تنها بر اساس فایل حاشیه‌نویسی ژن‌های شناخته‌شده، کمیت رونوشت‌ها را تعیین می‌کنند. تعیین کمیت رونوشت‌ها در حقیقت بسیار به صحت و درستی مرحله هم‌ردیف‌سازی و مکان‌یابی خوانش‌ها بر ژنوم مرجع و این که هر خوانش به درستی از چه ایزوفرمی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

می‌آید، بستگی دارد. اما بدلیل این که اندازه خوانش‌ها (۱۰۰bp) از طول کامل یک رونوشت (به‌طور تقریبی ۱۲۰۰bp) بسیار کمتر است، دستیابی به طول کامل رونوشت‌ها پس از مونتاژ، بسیار چالش برانگیز خواهد بود (۱۹).

بسته نرم‌افزاری استرینگ تای و استرینگ تای مرج (StringTie and StringTie merge) یکی از جدیدترین نرم‌افزارهای مورد استفاده برای مونتاژ خوانش‌ها و بازسازی ترانسکریپتوم است. این بسته نرم‌افزاری پس از دریافت فایل خروجی HISAT2، از خوانش‌های مکان‌یابی شده، به کمک فایل حاشیه‌نویسی، مونتاژ رونوشت‌ها را انجام داده و مجموعه‌ای از رونوشت‌ها و ایزوفرم‌هارا شناسایی می‌کند. علاوه‌بر این فراوانی هر یک از رونوشت‌ها را نیز تخمین‌زده و جدول شمارش خوانش‌ها (table counts) را برای مرحله بعدی آماده می‌کند. به‌طور تئوری هر ژنی که تعداد خوانش بیشتری (number of counts) با آن هم‌ردیفی و مکان‌یابی شده باشد سطح بیان بالاتری در ترانسکریپتوم دارد.

مستند سازی رونوشت‌های به دست آمده

برای تعیین عملکرد ژن‌های شناسایی شده در مرحله قبل، از بلاست این ژن‌ها با استفاده از انواع بلاست مناسب مانند Blast2GO و +BLAST در مقابل توالی‌های موجود در پایگاه‌های داده مانند NCBI-Nr proteins، UniProt و TAIR10 استفاده شده و توالی‌های مشابه با آنها در این پایگاه‌ها شناسایی می‌شود. سپس، دسته‌بندی ژن‌ها با توجه به مشخصات ژن‌های مشابه انجام می‌شود (۲۰، ۲۱). Blast2GO هم‌اکنون بخشی از اومیکس باکس است و به این نام شناخته می‌شود.

آنالیز بیان افتراقی ژن‌ها

یکی از اهداف اصلی در مطالعه ترانسکریپتوم و توالی‌یابی آر.ان.اِ، تعیین فهرست ژن‌هایی است که بیان آنها در نمونه تیمار نسبت به شاهد، به شکل معنی‌داری تغییر یافته است. هر تغییری در شرایط درونی یا بیرونی یک موجود زنده با تغییر در الگوی بیان ژن در آن موجود پاسخ داده می‌شود. بنابراین شناسایی ژن‌هایی که بیان آنها بین شرایط متفاوت و اختصاصی دچار تغییر شده است

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

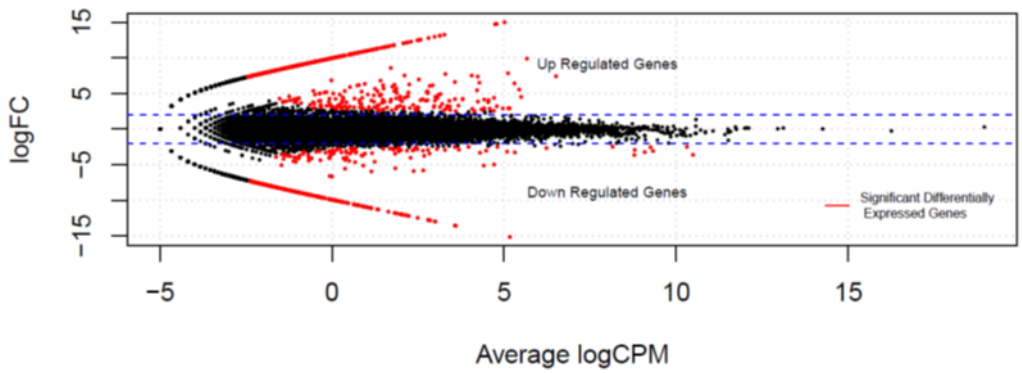
[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

differentially expressed genes,) DEGs) اهمیتی کلیدی در درک و شناسایی تغییرات فنوتیپیکی دارد. توالی‌یابی ترانسکریپتوم با فناوری پُربروندداد (high-throughput technologies) RNA-seq در سال‌های اخیر به انتخاب اصلی برای مطالعه الگوی بیان ژن‌های افتراقی تبدیل شده است. امروزه روش‌ها و نرم‌افزارهای کامپیوتری پرشماری برای آنالیز بیان افتراقی به کمک داده‌های RNAseq وجود دارد که تعداد آنها به سرعت در حال افزایش است. در بیشتر این نرم‌افزارها مانند edgeR (۲۲) یا baySeq (۲۳) پیش از انجام آنالیز افتراقی ژن‌ها، تعداد خوانش‌های مربوط به هر ژن که معرف مقدار بیان ژن است، به کمک عملیات نرمال‌سازی، در یک توزیع ویژه مانند دوجمله‌ای منفی (negative binomial) یا توزیع پویسون (Poisson) قرار داده می‌شود. به این ترتیب می‌توان مقدار (value) داده‌های ناموجود را از مشاهده مدل مورد استفاده و پارامترهای آن حدس زد. البته ابزارهای دیگری مانند NOIseq (۲۴) و SAMseq (۲۵) نیز برای آنالیز افتراقی ژن‌ها وجود دارد. برخی از روش‌های آنالیز بیان افتراقی ژن‌ها، مانند EBseq (۲۶) و Cuffdif (۲۷) برای ردیابی و کشف رونوشت‌ها و ایزوفرم‌های ناشناخته توسعه داده شده‌اند. با این وجود، توافقی روی مناسب‌ترین پایپ‌لاین و پروتکل برای دستیابی به نتایج معتبر از نظر قدرت، درستی و تکرارپذیری در شناسایی ژن‌های دارای بیان افتراقی وجود ندارد و پژوهش در این زمینه هنوز ادامه دارد (۲۸). یک بررسی مفصل، سیستماتیک و همه‌جانبه‌نگر در مورد آنالیز داده‌های RNAseq توسط Sahraeian و همکاران (۲۹) نشان داد که edgeR و Deseq2 از بیشترین توانایی برای شناسایی صحیح ژن‌های دارای بیان افتراقی برخوردار هستند. edgeR، با استفاده از فایل خروجی، StringTie، که محتوی جدول تعداد خوانش‌های مکان‌یابی‌شده با ژنوم مرجع برای هریک از نمونه‌ها است، ژن‌هایی را که نسبت به شاهد سالم تفاوت معنی‌داری در بیان دارند را شناسایی و گزارش می‌کند. پکیج edgeR، از دو شاخص FDR (false discovery rate) و LogFC

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

(log fold change) و آستانه p-value<0.05، به‌عنوان معیار شناسایی ژن‌هایی که در نمونه تیمار نسبت به شاهد تفاوت بیان معنی‌دار دارند، استفاده می‌کند. مقایسه تغییرات بیان ژن در نمونه تیمار نسبت به مقادیر متوسط بیان آن ژن در MA Plot نمایش داده می‌شود. نمونه‌ای از این پلات برای تغییرات بیان ژن در گیاه گردوی ایرانی پس از آلودگی به قارچ بیمارگر *Ophiognomonia leptostyla* عامل بیماری آنتراکنوز گردو در شکل ۲ مشاهده می‌شود (۱). نقاط قرمز نشانگر ژن‌هایی است که شاخص FDR در آنها از ۰/۰۰۱ کمتر بوده و بیان آنها نسبت شاهد سالم معنی‌دار است. ژن‌هایی که بیان آنها تفاوت معنی‌داری نداشته با نقاط سیاه نشان داده می‌شود که در اطراف خط افق جمع می‌شوند.



شکل ۲- مقایسه تغییرات بیان ژن در میزبان گردوی ایرانی (رقم چندلر) ۴۸ ساعت پس از آلودگی با *O. leptostyla* بر اساس (log_2FC) نسبت به مقادیر متوسط بیان آن ژن ($log_{10}CPM$)، در دو نمونه تیمار و شاهد. نقاط قرمز: ژن‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار. نقاط سیاه: ژن‌های مشابه در بیان (۱).

ارزیابی ژن‌های افتراقی درگیر در پاسخ‌های دفاعی گیاه

مطالعات نشان می‌دهد که سیستم ایمنی در گیاه شامل دو لایه اصلی است. لایه اول شامل مجموعه‌ای از گیرنده‌های تراغشایی است مانند گیرنده‌های دارای دومین خارج سلولی غنی از لوسین (leucin reach repeat) که پس از شناسایی الگوی مولکولی همراه بیمارگر (pathogen associated molecular patterns,

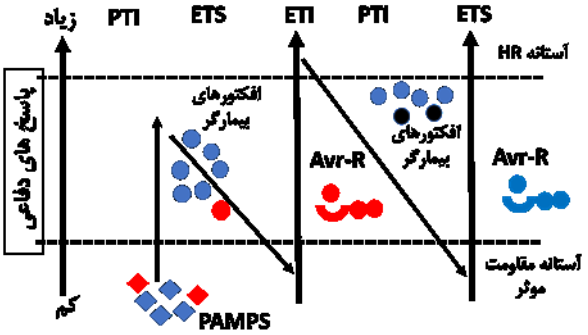
[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

PAMP) با فعال‌کردن مجموعه‌ای از پروتئین کینازهای وابسته به میتوژن (mitogen activated protein kinase, MAP-Kinase) پیام را منتقل می‌کنند. لایه دوم سیستم ایمنی که بیشتر درون سلولی است، با پروتئین‌های مقاومت یا محصولات ژن‌های R کار می‌کند. بر اساس مدل زیگزاکی جونز و دانگل (شکل۳)، نخست با شناسایی PAMPs به وسیله PRRs پاسخ ایمنی حاصل PAMP به راه می‌افتد که آن را دفاع بنیادین یا PTI (PAMP- triggered immunity) می‌نامند. این پاسخ می‌تواند از ادامه کلونیزه‌شدن گیاه جلوگیری کند. اجزاء دیواره سلولی گیاه نیز که در نتیجه فعالیت هیدرولیزی آنزیم‌های بیمارگر تولید می‌شوند، می‌توانند به‌عنوان PAMP عمل کرده و این مقاومت را برانگیزند. پروفیل مولکولی PAMP ترکیباتی دیگر مانند لیپوپلی‌ساکاریدها، کیتین‌ها،گلوکان و فلاژین‌ها را نیز شامل می‌شود (۳۱،۳۲). برخی از بیمارگرها با تولید افکتورها دفاع ذاتی گیاه را شکسته یا سرکوب می‌کنند در این حالت لایه دوم ایمنی در گیاه پس از شناسایی افکتورهای بیمارگر به وسیله گیرنده‌های درون سلولی پروتئین‌های R رخ می‌دهد که ایمنی شروع شونده با افکتور یا ETI (effector- triggered immunity) نامیده می‌شود. ETI در حقیقت نوع تقویت‌شدهٔ پاسخ PTI است که سبب بروز مقاومت می‌شود. از ETI به‌طور معمول با عنوان پاسخ مرگ سلولی ناشی از حساسیت (hypersensitive reaction) نیز یاد می‌شود. فرآیند ETI، در حقیقت نتیجه تکامل همراه گیاه و بیمارگر است. در مرحله بعدی فشار انتخاب طبیعی در بیمارگر برای اجتناب از ETI وارد عمل می‌شود تا ژن‌های افکتور را بپوشاند یا گوناگون کند. فشار انتخاب طبیعی در میزبان سبب بروز انواع جدید و اختصاصی از ژن‌های R و رخداد دوباره ETI می‌شود (۳۰). فعال‌شدن هریک از دو فرآیند PTI یا ETI مقاومت گیاه به بیماری را افزایش داده و رشد بیمارگر را محدود می‌کند (۴،۲). حمله بیمارگر بیان انبوهی از اجزاء مربوط به سیستم ایمنی ذاتی گیاه را دچار تغییر می‌کند. فهرست اجمالی از این اجزاء که بیان آنها پس از آلودگی تغییر می‌کند در ادامه آورده می‌شود.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]



شکل ۳- مدل زیگزاکی در مورد سیستم ذاتی ایمنی گیاه (۳۰).

فاکتورهای رونویسی

فاکتورهای رونویسی بخشی از مجموعه تنظیم‌کننده‌های اصلی در کنترل انواع فرآیندهای مرتبط با تمایز گیاه و پاسخ به محرک‌های خارجی هستند. فاکتورهای رونوشت‌برداری AP2/ERF (APETALA2/ethylene responsive factor)، bHLH (basic helix-loop-helix)، MYB و WRYK از جمله مهمترین فاکتورهای رونویسی هستند که در پاسخ گیاه به بیمارگرها دخالت دارند. فاکتورهای رونویسی با تنظیم بیان ژن در پاسخ‌های دفاعی PTI، PTI، مسیرهای پیام‌رسانی با هورمون، تولید متابولیت‌های ثانویه و ساخت فیتوالکسین‌ها دخالت دارند (۳۳). هر چند بیان این فاکتورها به نوبه خود در معرض تغییرات زمان رونوشت‌برداری و تغییرات پس ازرونوشت‌برداری قرار دارد (۳۴). تحقیقات نشان داده است که بیان فاکتورهای رونویسی WRYK 75،53،33 پس از آلودگی به بیمارگرهای گیاهی افزایش می‌یابد (۳۵، ۳۶). نقش این فاکتورهای رونویسی در تنظیم پاسخ‌های دفاعی ثابت شده است. پروتئین‌های WRKY به W-box (TGACC(A/T) در پیشبر ژن‌های هدف خود متصل شده و بیان ژن‌های پایین‌دست خود را فعال یا سرکوب می‌کنند. افزون‌بر این، پروتئین‌های WRKY جزئی از شبکه پیچیده پیام‌رسانی با هورمون‌ها بوده و در تعامل با دیگر فاکتورهای رونویسی، پاسخ‌های دفاعی گیاه را نیز تنظیم می‌کنند. این پروتئین‌ها ممکن است در بالا یا پایین‌دست هورمون‌ها عمل

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

کرده و در عملکردهای مخالف مسیرهای وابسته به اسید سالسیلیک در برابر اسید جاسمونیک/اتیلن، کنترل فرآیندهای تمایزی با اُکسین‌ها، سیتوکنین‌ها و براسینواستروئیدها (brassinosteroids) دخالت داشته باشند (۳۷، ۳۸). در گیاه برنج پروتئین‌های WRKY53 و WRKY70 در پیام‌رسانی اسید آبسیزیک و جیبرلیک اسید نقش تنظیمی منفی دارند (۳۹). بیان چهار نوع پروتئین JrWRKY 75،70،53،33 با کارکرد شناخته شده در پاسخ دفاعی به بیمارگر در برهمکنش گردو ایرانی رقم چندلر با *O. leptostyla* نسبت به شاهد سالم افزایش یافت. پروتئین‌های MYB (myeloblastosis) دسته‌ای دیگر از فاکتورهای رونویسی هستند که در تنظیم بیان ژن مبتنی‌بر پاسخ به جاسمونیت (jasmonate-responsive gene expression) نقش دارند (۴۰). افزایش بیان MYB108 در پنبه پس از آلودگی به *Verticillium dahlia* در افزایش تحمل گیاه میزبان به بیماری نقش دارد (۴۱). در میزبان گردوی چندلر پس از آلودگی به عامل آنتراکنوز، ژن *JrMYB108* با چهار ارتولوگ بیشترین فراوانی و بیشترین افزایش بیان را در میان ژن‌های مشابه نشان داد (۱). فاکتور رونویسی bHLH112 در *آرابیدوپسیس تالیانا* بیان آنزیم‌های SOD (superoxid dismutase) و POD (peroxidase) را تنظیم می‌کند. این آنزیم‌ها از مهمترین آنزیم‌های جمع‌آوری‌کننده رادیکال‌های اکسیژن آزاد هستند (۴۲). الگوی تغییرات بیان فاکتورهای ERF پس از آلودگی بسیار پیچیده است و شامل تغییرات همزمان کاهشی و افزایشی می‌شود (۱). فاکتورهای ERF در پیام‌رسانی مبتنی‌بر اسید آبسیزیک نقش دارند (۴۳).

پروتئین‌های دارای ساختار انگشت روی

این پروتئین‌ها یک دومین عملکردی دارند که آزادانه تاخورده و دارای یک یا چند یون Zn است. وجود یون Zn برای نگهداری ساختار این دومین‌ها ضروری است و به‌اصطلاح انگشت روی نامیده می‌شود. این پروتئین‌ها افزون‌بر نقش‌های پرشمار و گوناگون در بسیاری از فرآیندهای گیاهی، در تنظیم پاسخ‌های دفاعی گیاه به بیماری نیز دخالت دارند (۴۴، ۴۵). این دومین‌ها

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

به‌صورت فعال در تنظیم اتصال بخش‌های ویژه‌ای از توالی آر.ان.اِ یا دی.ان.اِ و فرآیند تعامل و شناسایی پروتئین-پروتئین نقش دارند. نقش برخی از این پروتئین‌ها مانند ZAT12 و ZAT10 در پاسخ‌های دفاعی گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* به اثبات رسیده است. بیان این پروتئین‌ها در پاسخ به تنش اکسیداتیو افزایش می‌یابد.

کینازهای شبه گیرنده (receptor-like kinases)

کینازهای شبه گیرنده در انواعی از پاسخ‌های گیاه به بیمارگرها شامل پاسخ به دامنه گسترده‌ای از بیمارگرها، پاسخ‌های دفاعی مبتنی‌بر الیسیتورها (elicitors) و پاسخ دفاعی به نژاد ویژه‌ای از بیمارگر (race-specific pathogen defense) به‌عنوان دومینی ویژه در پروتئین‌های ژن‌های مقاومت (resistance (R) genes) شرکت دارند (۴۶). بیشتر این پروتئین‌ها از زیرکلاس تکرارهای غنی از لوسین هستند. نقش پروتئین‌کیناز LRR-RLS/T-protein kinase EFR در پاسخ دفاعی به الیستورهای باکتری در *آرابیدوپسیس تالیانا* ثابت شده است (۴۷).

پروتئین‌های PR

پروتئین‌های PR، پروتئین‌هایی هستند که تولید آنها در زمان آلودگی به بیماری القاء می‌شود هرچند ممکن است تاثیر مستقیمی بر بیمارگر نداشته باشند (۴۸). با این وجود چندین پروتئین PR دارای فعالیت آنزیمی با ویژگی‌های ضدمیکروبی نیز شناخته شده‌اند (۵۰). هفده خانواده از پروتئین‌های PR در گیاهان شناسایی شده است. مطالعات قبلی نشان داده بود که پروتئین‌های PR-1، به‌دلیل اتصال به استرول‌ها در بیمارگرهای قارچی مانند گونه‌های *Phytophthora* spp.، ویژگی ضدمیکروبی دارند. پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهد که PR-1 در پیام‌رسانی سیستم ایمنی گیاه نقش دارد (۵۱). پروتئین‌های PR-4 نیز در پاسخ‌های دفاعی میزبان شرکت می‌کنند که با مولکول‌های پیام‌رسانی مانند اسید سالسیلیک، اسید آبسیزیک، اسید جاسمونیک و اتیلن تنظیم می‌شوند (۵۰). بیان ژن *PR-4* در کاکائو، ذرت و گندم در ساعات نخستین آلودگی (تا ۹۶ ساعت) افزایش پیدا می‌کند (۳۸، ۵۲، ۵۳). از خانواده پروتئینی PR-5،

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

پروتئین‌های شبه تاموتین (thaumatin-like) با تخریب غشاء پلاسمایی سلول‌های بیمارگر قارچی و ایجاد روزنه در این غشاء، نفوذپذیری انتخابی غشاء پلاسمایی را به سرعت از بین می‌برد (۵۴). اسموتین (osmotin) پروتئین دیگری از R-5 به‌دلیل تداخل در شبکه انتقال پیام در واکنش‌های حیاتی بیمارگر قارچی، خاصیت ضد قارچی داشته و در دفاع نقش دارد. غلظت رونوشت ژن *PdPR5-1* در کولتیوار مقاوم آلو -پس از آلودگی به *Monilinia fructicola*- نسبت به کولتیوار حساس به شدت افزایش یافت (۵۵).

آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره سلولی (کیتینازها و بتا ۱و ۳ گلوکانازها)

کیتینازها (Chitinases) اتصال گلیوزیدی در کیتین را تجزیه می‌کنند و به‌طور طبیعی به وسیله دامنه گسترده‌ای از موجودات زنده مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، گیاهان، اکتینومیست‌ها و انسان تولید می‌شوند (۵۶). کیتین مهمترین ترکیب دیواره سلولی در قارچ‌ها است. کیتینازها اغلب به‌دلیل خاصیت قارچ‌کشی در خانواده پروتئین‌های PR دسته‌بندی می‌شوند (۵۷). در مطالعات مقدماتی بیان پی‌درپی چندین ژن کیتیناز از کلاس‌های مختلف به تنهایی یا همراه با دیگر پروتئین‌های ضدقارچی، مقاومت میزبان به بیمارگر قارچی را افزایش داد (۵۸). اگرچه مطالعات بعدی نشان داد که بیان پی‌درپی ژن کیتیناز به رشد گیاه آسیب زده و محصول را به میزان قابل‌توجهی کاهش می‌هد. در مطالعه‌ای یک ژن کیتیناز در خردل چینی (*Brassica juncea*.) شناسایی شد که در پاسخ به آلودگی بیمارگر قارچی، اسید سالسیلیک (SA) و اسید جاسمونیک (JA) بیان آن افزایش می‌یابد (۵۹). بیان ۱۴ ژن کدکننده کیتیناز در گردوی چندلر ۱۴۴ ساعت پس از مایه‌زنی با عامل بیماری آنتراکنوز نسبت به شاهد سالم افزایش یافت (۱). بتا ۱ و ۳ گلوکاناز از آنزیم‌های فراوان و معمول در گیاهان است و در گونه‌های مختلف گیاهی شناسایی و توصیف شده است. این آنزیم‌ها در تقسیم سلولی، جابجایی مواد از پلاسمودسماتا، تشکیل گل و بلوغ بذر نقش دارند. آنزیم‌های بتا ۱ و ۳ گلوکاناز همچنین در پاسخ‌های دفاعی گیاه به بیمارگرهای قارچی به تنهایی یا در همراهی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

با کیتینازها و دیگر پروتئین‌های ضدقارچی، مشارکت می‌کنند. گزارش‌های زیادی از موفقیت تولید تراریخته این آنزیم‌ها در محصولات مختلف به تنهایی یا همراه با دیگر پروتئین‌های ضدقارچی وجود دارد که نقش و ظرفیت این دسته از پروتئین‌ها را در کنترل بیمارگرهای قارچی تایید می‌کند (۶۰).

پراکسیدازها

پراکسیدازهای گیاهی گروهی دیگر از پروتئین‌های القایی هستند که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم در پاسخ‌های دفاعی و در دامنه گسترده‌ای از فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه شامل تشکیل لیگنین و سوبرین، تولید فیتوالکسین‌ها، متابولیسم ROS و مسیرهای پیام‌رسانی پاسخ‌های دفاعی مشارکت می‌کنند (۶۱). الگوی تغییرات بیان پراکسیدازها پس از مایه زنی با از *O. leptostyla* نسبت به شاهد سالم بسیار پیچیده بود. با گذشت زمان از آلودگی، تعداد ژن‌های پراکسیداز بیشتری در میزبان دچار افزایش بیان می‌شود که بیانگر تأخیر پاسخ‌های مبتنی‌بر بیان آنزیم‌های پراکسیداز است (۱).

آنالیز مسیرهای بیوشیمیایی فعال‌شده

آنالیز مسیرهای بیوشیمیایی فعال‌شده، بخش دیگری از مطالعه پاسخ‌های دفاعی میزبان گیاهی به بیمارگر است. یکی از روش‌های مناسب برای انجام این آنالیز، بلاست توالی ژن‌های افتراقی با پایگاه اطلاعاتی KEGG و با کمک ابزار KEGG Mapper است (۶۲). از میان مسیرهای متعددی که در این آنالیز شناسایی می‌شود، مسیرهای مرتبط با برهمکنش میزبان با بیمارگر، مسیر پیام‌رسانی با MAPK، مسیر انتقال پیام به وسیله هورمون‌ها، مسیر بیوسنتز فنیل پروپانویید (phenylpropanoid biosynthesis) از مهمترین آنها است.

مسیرهای بیوشیمیایی فعال‌شده در برهمکنش میزبان-بیمارگر

پس از دریافت مولکول‌های PAMP، غلظت سیتوپلاسمی یون Ca^{2+} به سرعت افزایش می‌یابد. سیگنال کلسیم به وسیله پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم (calcium-dependent protein kinase, CDPK) و پروتئین‌های کالمودولین و شبه کالمودولین (CaM/CML) دریافت شده و

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

پس از تولید انواع اکسیژن فعال (reactive oxygen species) در یک رشته از واکنش‌های بیوشیمیایی انتقال می‌یابد که نتیجه آنها القاء پاسخ‌های دفاعی است (۶۳). بیان پروتئین‌های CNGCs (cyclic nucleotide-gated ion channel)، CDPK و CaM/CML، در ترانسکریپتوم برهمکنشی با بیمارگر افزایش یافت (۳۵). به‌طور معمول پس از درک و شناسایی الگوی مولکولی PAMP، یک مجموعه از MAPK، فعال می‌شود که با فعالیت مجموعه بزرگی از فاکتورهای رونویسی WRKY و به دنبال آن بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ‌های دفاعی همراه است (۶۴). تغییر بیان ژن‌ها در مسیر برهمکنش میزبان–بیمارگر افزون‌بر افزایش بیان ارتولوگ‌های دخیل در پاسخ‌های دفاعی PTI، گاهی با کاهش بیان برخی از این ارتولوگ‌ها همراه است (۳۶). ژن‌های (disease resistance protein) *RPM1*، (pathogenesis-related protein) *PTI5*، (genes transcriptional activator) *RPS2*، (disease resistance protein) *EDS1* (enhanced disease susceptibility 1 protein)، *PR1* و *KCS1/10* (3-ketoacyl-CoA synthase) از جمله ژن‌های دخیل در ETI هستند که رونوشت‌های مربوط به آنها پس از آلودگی به بیماری افزایش می‌یابد (۳۵). با گذشت زمان از شروع آلودگی تعداد و نوع ژن‌های افتراقی در مسیر برهمکنش میزبان–بیمارگر افزایش یافت (۱).

ژن‌های افتراقی در مسیرهای پیام‌رسانی هورمونی

هورمون‌های گیاهی به‌عنوان پیام‌رسان‌های مهم برای فعال‌شدن پاسخ‌های دفاعی شناخته‌شده‌اند (۶۵). بیماری مسیر انتقال پیام برخی از هورمون‌های مهم گیاهی مانند اکسین، سیتوکینین، اسید جاسمونیک (JA)، اسید سالسلیک (SA) و اتیلن (ET) را در گیاه بیمار متاثر می‌سازد (۳۵، ۳۶). تغییر بیان این ژن‌ها ممکن است به‌صورت افزایش یا کاهش تظاهر کند. در ترانسکریپتوم برهمکنشی میزبان با *Peronophythora litchii*، ژن‌های (auxin-responsive protein IAA) *AUXIAA*، (auxin-response factor) *ARF*، (auxin responsive GH3 gene

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

GH3 family) و SAUR (SAUR family protein) در مسیر انتقال پیام با اکسین، شناسایی شده‌اند (۳۵). ژن‌های شرکت‌کننده در مسیرهای انتقال پیام با سیتوکینین، براسینواستروییید و اسید آبسیزیک نیز در ترانسکریپتوم برهمکنشی میزبان ممکن است دچار افزایش یا کاهش بیان شوند. کاهش بیان هورمون‌های کنترل‌کننده رشد و تقسیم سلول در ساعات اولیه پس از آلودگی تاییدکننده چرخش مسیر رشد طبیعی میزبان پس از آلودگی به سمت پاسخ‌های دفاعی است (۶۶).

تغییر بیان ژن‌های مرتبط با مسیر JA مانند *JAZ* (jasmonate ZIM domain-containing protein) و *MYC2* (transcription factor MYC2) در تراسکریپتوم برهمکنشی میزبان-بیمارگر افزایش یافت (۱). اسید سالسیلیک مهمترین هورمون گیاهی در تنظیم پاسخ‌های دفاعی گیاه به بیمارگرهای بیوتروف است. بیان ژن‌های (transcription factor TGA) *TGA* و *PR-1* از مسیر انتقال پیام با اسید سالسیلیک در ترانسکریپتوم برهمکنشی افزایش یافت (۳۵).

ژن‌های مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوییید با بیان افتراقی پس از آلودگی

مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوییید، یکی از مسیرهای متابولیت‌های ثانویه است که در ساخت اجزا دیواره سلولی مانند لیگنین، دخالت دارد و با تقویت یا ساخت موانع فیزیکی و شیمیایی در برابر بیمارگر، نقش مهمی در پاسخ‌های دفاعی گیاه به عهده دارد (۶۷). آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز (PAL)، به‌عنوان نخستین آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز فنیل‌پروپانویید در پاسخ به آلودگی بیمارگر افزایش می‌یابد (۳۵، ۳۶). لیگنین یکی از ترکیبات شناخته شده و موثر در پاسخ‌های دفاعی در برابر بیمارگرهای گیاهی است (۶۸). بیان شمار زیادی از آنزیم‌های مورد نیاز در بیوسنتز لیگنین در میزبان پس از آلودگی به بیمارگر القاء می‌شود. از جمله رونوشت‌های کدکننده آنزیم‌های CAD (cinnamyl-alcohol dehydrogenase)، پراکسیداز، (4-coumarate-CoA ligase) 4CL، (cinnamoyl-CoA reductase) CCR، CCoAOMT، F5H (ferulate-5-hydroxylase) و CYP73A

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

(trans-cinnamate 4-monooxygenase) که بیان آنها پس از آلودگی القاء می‌شود (۳۶). نقش کلیدی پروتئین‌های CCoAOMT و HCT در بیوسنتز لیگنین و بروز پاسخ دفاعی در ذرت تایید شده است (۶۹). رونوشت‌هایی که با مسیر بیوسنتز فنیل پروپانویید و فیتوالکسین کاملکسین (camalexin) ارتباط دارند، پس از وقوع بیماری در کولتیوار مقاوم افزایش چشمگیری نشان داد (۵۵).

نتیجه‌گیری

گیاهان مسیرهای پیام‌رسانی و دفاعی بسیار پیچیده‌ای را در طول دوره طولانی زندگی خود در پاسخ به حمله بیمارگرها تکامل داده‌اند. شناسایی و درک این فرآیندها اطلاعات ژنومیکی مورد نیاز را برای به‌نژادی محصولات مهم اقتصادی فراهم می‌آورد. فناوری پُربروندداد RNA-seq به‌دلیل توانایی در آنالیز بیان صدها ژن به‌طور همزمان، یکی از بهترین ابزارهای مطالعه پاسخ‌های دفاعی میزبان گیاهی به بیمارگرها است. بیماری رخداد بسیار شدیدی است که میزبان برای رویارویی و مدیریت آن ناگزیر از اعمال تغییرات عمده در بسیاری از مسیرهای بیوشیمیایی و متابولیکی خویش است. تغییر فیزیولوژیکی گیاه از حالت رشد و نمو عادی به حالت تدافعی نیازمند برنامه‌ریزی دوباره و ایجاد تغییرهمزمان در الگوی بیان صدها ژن و مسیرهای تنظیمی آنها است. تغییر در هموستازی هورمون‌ها (بازیگران اصلی در مسیرهای رشد و نمو)، فعال شدن مسیرهای بیوشیمیایی مرتبط با پاسخ‌های دفاعی، پیام‌رسانی‌های اولیه و ثانویه و تولید متابولیت‌های ثانویه، مهمترین این تغییرات هستند.

فهرست منابع

References

۱. خلقتی‌بناء، ف، (۱۳۹۹). پایان‌نامه دکتری با عنوان "تجزیه ترانسکریپتومی برهمکنش *Ophiognomonia leptostyla*، عامل بیماری آنتراکنوز گردو با میزبان به کمک RNA-seq". دانشگاه تهران . ۳۱۰ ص.

۲. خلقتی‌بناء، ف، صفایی، ن و مسلم‌خانی، ک. کاربرد مهندسی ژنتیک برای مقاومت به بیماری‌های گیاهی. (۱۳۹۳). انتشارات مرکز آموزش کشاورزی. ۲۱۰ص.

3. Grzechowiak M. (2014). The role of WRKY transcription factors in plants. BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology. 95(3).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

4. Bari R. and Jones J.D. (2009). Role of plant hormones in plant defense responses. Plant Molecular Biology. 69, 473-488.

5. Van Loon L.C., Rep M. and Pieterse C.M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual. Review in. Phytopathology. 44, 135-162.

6. Conesa A., Madrigal P., Tarazona S., Gomez-Cabrero D., Cervera A., McPherson A., Wojciech Szcześniak M., Gaffney D.J., Elo L.L., Zhang Xu. and Mortazavi A. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. Genome Biology. 17(1), 13.

7. Jänes J., Hu F., Lewin A. and Turro E. (2015). A comparative study of RNA-seq analysis strategies. Briefings in Bioinformatics. 16, 932-940.

8. Goodwin S., McPherson J.D. and McCombie W.R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. Nature Reviews Genetics. 17(6), 333.

9. Mortazavi A., Williams B.A., McCue K., Schaeffer L. and Wold B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nature methods. 5(7), 621-628.

10. Lelandais-Brière C., Naya L., Sallet E., Calenge F., Frugier F., Hartmann C., Gouzy J. and Crespi M. (2009). Genome-wide Medicago truncatula small RNA analysis revealed novel microRNAs and isoforms differentially regulated in roots and nodules. The Plant Cell. 21(9), 2780-2796.

11. Wang Z., Gerstein M. and Snyder M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nature Reviews Genetics. 10, 57-63.

12. Syed N.H., Kalyna M., Marquez Y., Barta A. and Brown J.W. (2012). Alternative splicing in plants–coming of age. Trends in Plant Science. 17, 616-623.

13. De Wit P., Pespeni M.H., Ladner J.T., Barshis D.J., Seneca F., Jaris H. and Palumbi S.R. (2012). The simple fool's guide to population genomics via RNA-Seq: an introduction to high-throughput sequencing data analysis. Molecular Ecology Resources. 12, 1058-1067.

14. Bolger A.M., Lohse M. and Usadel B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 30(15), 2114-2120.

15. Langmead B., Trapnell C., Pop M. and Salzberg S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biology. 10, R25.

16. Li H. and Durbin R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. Bioinformatics. 25, 1754-1760.

17. Ferragina P. and Manzini, G. (2000). Opportunistic data structures with applications. In Proceedings 41st Annual Symposium on Foundations of Computer Science (pp. 390-398). IEEE.

18. Kim D., Langmead B. and Salzberg S.L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. Nature Methods. 12(4), 357.

19. Pertea M., Kim D., Pertea G.M., Leek J.T. and Salzberg S.L. (2016). Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. Nature protocols. 11, 1650.26.

20. Conesa A. and Götz S. (2008). Blast2GO: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. International journal of plant genomics. 619832,1-12 doi:10.1155/2008/619832

21. OmicsBox – Bioinformatics Made Easy, BioBam Bioinformatics. (March 3, 2019). https://www.biobam.com/omicsbox.

22. Robinson M.D., McCarthy D.J. and Smyth G.K. (2010). edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics. 26(1), 139-140.

23. Hardcastle T.J. and Kelly K.A. (2010). baySeq: empirical Bayesian methods for identifying differential expression in sequence count data. BMC Bioinformatics. 11(1), 422.

24. Tarazona S., Furió-Tarí P., Turrà D., Pietro A.D., Nueda M.J., Ferrer A. and Conesa A. (2015). Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. Nucleic acids research. 43, e140-e140.

25. Li J., Li J. and Tibshirani R. (2013). Finding consistent patterns: a nonparametric approach for identifying differential expression in RNA-Seq data. Statistical Methods in Medical Research. 22, 519-536.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

26. Leng N., Dawson J.A., Thomson J.A., Ruotti V., Rissman A.I., Smits B.M., Haag J.D., Gould M.N., Stewart R.M. and Kendziorski C. (2013). EBSeq: an empirical Bayes hierarchical model for inference in RNA-seq experiments. Bioinformatics. 29, 1035-1043.

27. Trapnell C., Hendrickson D.G., Sauvageau M., Goff L., Rinn J.L. and Pachter L. (2013). Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. Nature Biotechnology. 31, 46.

28. Costa-Silva J., Domingues D. and Lopes F.M. (2017). RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. PloS One. 12 (12).

29. Sahraeian S.M.E., Mohiyuddin M., Sebra R., Tilgner H., Afshar P.T., Au K.F., Bani Asadi N., Gerstein M.B., Wong W.H., Snyder M.P. and Schadt E. (2017). Gaining comprehensive biological insight into the transcriptome by performing a broad-spectrum RNA-seq analysis. Nature communications. 8(1), 1-15.

30. Jones J.D. and Dangl J.L. (2006). The plant immune system. Nature. 444, 323-329.

31. Nürnberger T. and Lipka V. (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. Molecular plant pathology. 6(3), 335-345.

32. Schwessinger B. and Zipfel C. (2008). News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. Current Opinion in Plant Biology. 11(4), 389-395.

33. Seo E. and Choi D. (2015). Functional studies of transcription factors involved in plant defenses in the genomics era. Briefings in Functional Genomics. 14, 260-267.

34. Ng D.W., Abeysinghe J.K. and Kamali M. (2018). Regulating the regulators: The control of transcription factors in plant defense signaling. International Journal of Molecular Sciences. 19(12), 3737.

35. Sun J., Cao L., Li H., Wang G., Wang S., Li F., Zou Xi. and Wang J. (2019). Early responses given distinct tactics to infection of *Peronophythora litchii* in susceptible and resistant litchi cultivar. Scientific Reports. 9(1), 1-14.

36. Zhang W., Yan J., Li X., Xing Q., Chethana K.T. and Zhao W. (2019). Transcriptional response of grapevine to infection with the fungal pathogen *Lasiodiplodia theobromae*. Scientific Reports. 9(1), 1-12.

37. Chen H., Lai Z., Shi J., Xiao Y., Chen Z. and Xu X. (2010). Roles of Arabidopsis WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress. BMC Plant Biology. 10(1), 281.

38. Agarwal P., Reddy M.P. and Chikara J. (2011). WRKY: its structure, evolutionary relationship, DNA-binding selectivity, role in stress tolerance and development of plants. Molecular Biology Reports 38(6), 3883-3896.

39. Zhang L., Gu L., Ringler P., Smith S., Rushton P.J. and Shen Q.J. (2015). Three WRKY transcription factors additively repress abscisic acid and gibberellin signaling in aleurone cells. Plant Science. 236, 214-222.

40. Lorenzo O., Chico J.M., Sánchez-Serrano J.J. and Solano R. (2004). Jasmonate-Insensitive1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. The Plant Cell. 16, 1938-1950.

41. Cheng H.Q., Han L.B., Yang C.L., Wu X.M., Zhong N.Q., Wu J.H., Wang F.X., Wang H.Y. and Xia G.X. (2016). The cotton MYB108 forms a positive feedback regulation loop with CML11 and participates in the defense response against *Verticillium dahliae* infection. Journal of Experimental Botany. 67, 1935-1950.

42. Liu Y., Ji X., Nie X., Qu M., Zheng L., Tan Z. and Wang Y. (2015). Arabidopsis Atb HLH 112 regulates the expression of genes involved in abiotic stress tolerance by binding to their E-box and GCG-box motifs. New Phytologist. 207, 692-709.

43. Hong E., Lim C.W., Han S.W. and Lee S.C. (2017). Functional analysis of the pepper ethylene-responsive transcription factor, CaAIEF1, in enhanced ABA sensitivity and drought tolerance. Frontiers in Plant Science. 8, e1407:1-13.

44. Feurtado J.A., Huang D., Wicki-Stordeur L., Hemstock L.E., Potentier M.S., Tsang E.W. and Cutler A.J. (2011). The Arabidopsis C2H2 zinc finger indeterminate domain1/enhydrous promotes the transition

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

to germination by regulating light and hormonal signaling during seed maturation. The Plant Cell. 23, 1772-1794.

45. Giri J., Vij S., Dansana P.K. and Tyagi A.K. (2011). Rice A20/AN1 zinc-finger containing stress-associated proteins (SAP1/11) and a receptor-like cytoplasmic kinase (OsRLCK253) interact via A20 zinc-finger and confer abiotic stress tolerance in transgenic Arabidopsis plants. New Phytologist. 191, 721-732.

46. Goff K.E. and Ramonell K.M. (2007). The role and regulation of receptor-like kinases in plant defense. Gene Regulation and Systems Biology. 1, 117762500700100015.

47. Lal N.K., Nagalakshmi U., Hurlburt N.K., Flores R., Bak A., Sone P. and He P. (2018). The receptor-like cytoplasmic kinase BIK1 localizes to the nucleus and regulates defense hormone expression during plant innate immunity. Cell Host and Microbe. 23, 485-497.

48. Sels J., Mathys J., De Coninck B.M., Cammue B.P. and De Bolle M.F. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. Plant Physiology and Biochemistry. 46(11), 941-950.

49. Van Loon L.C. (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. European Journal of Plant Pathology. 103(9), 753-765.

50. Menezes S.P., de Andrade Silva E.M., Lima E.M., de Sousa A.O., Andrade B.S., Lemos L.S.L. and Micheli F. (2014). The pathogenesis-related protein PR-4b from *Theobroma cacao* presents RNase activity, Ca^{2+} and Mg^{2+} dependent-DNase activity and antifungal action on Moniliophthora perniciosa. BMC Plant Biology. 14, 161.

51. Breen S., Williams S.J., Outram M., Kobe B. and Solomon P.S. (2017). Emerging insights into the functions of pathogenesis-related protein 1. Trends in Plant Science. 22, 871-879.

52. Caruso C., Chilosi G., Caporale C., Leonardi L., Bertini L., Magro P. and Buonocore V. (1999). Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with Fusarium culmorum. Plant Science. 140, 87-97.

53. Bravo J.M., Campo S., Murillo I., Coca M. and San Segundo B. (2003). Fungus-and wound-induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of the pathogenesis-related protein 4 (PR-4) family of maize. Plant Molecular Biology. 52(4), 745-759.

54. Vigers A.J., Wiedemann S., Roberts W.K., Legrand M., Selitrennikoff C.P. and Fritig B. (1992). Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. Plant Science. 83, 155-161.

55. El-Kereamy A., El-Sharkawy I., Ramamoorthy R., Taheri A., Errampalli D., Kumar P. and Jayasankar S. (2011). *Prunus domestica* pathogenesis-related protein-5 activates the defense response pathway and enhances the resistance to fungal infection. PLoS One. 6(3).

56. Henrissat B. and Davies G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. Current Opinion in Structural Biology. 7, 637-644 .

57. Winkler A.J., Dominguez-Nuñez J.A., Aranaz I., Poza-Carrión C., Ramonell K., Somerville S. and Berrocal-Lobo M. (2017). Short-chain chitin oligomers: Promoters of plant growth. Marine Drugs. 15, 40.

58. Broglie R. and Broglie K. (1993). Chitinase gene expression in transgenic plants: a molecular approach to understanding plant defence responses. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences. 342(1301), 265-270.

59. Rawat S., Ali S., Mittra B. and Grover A. (2017). Expression analysis of chitinase upon challenge inoculation to Alternaria wounding and defense inducers in Brassica juncea. Biotechnology Reports. 13, 72-79.

60. Balasubramanian V., Vashisht D., Cletus J. and Sakthivel N. (2012). Plant β-1, 3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. Biotechnology Letters. 34, 1983-1990.

61. Almagro L., Gómez Ros L.V., Belchi-Navarro S., Bru R., Ros Barceló A. and Pedreno M.A. (2009). Class III peroxidases in plant defense reactions .Journal of Experimental Botany. 60, 377-390.

62. Kanehisa M. and Sato Y. (2019). KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. Protein Science. 29, 28-35.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]

63. Xu B., Cheval C., Laohavisit A., Hocking B., Chiasson D., Olsson T.S., Shirasu K., Faulkner C. and Gilliham M. (2017). A calmodulin-like protein regulates plasmodesmal closure during bacterial immune responses. New Phytologist. 215(1), 77-84.
64. Dodds P.N. and Rathjen J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. Nat Rev Genet. 11, 53948.
65. Pieterse C.M., Van der Does D., Zamioudis C., Leon-Reyes A. and Van Wees S.C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. Annual review of cell and developmental biology, 28.protein 4 (PR-4) family of maize. Plant Molecular Biology. 52, 745-759.
66. Huot B., Yao J., Montgomery B.L. and He S.Y. (2014). Growth–defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. Molecular Plant. 7, 1267-1287.
67. Dixon R.A., Achnine L., Kota P., Liu C.J., Reddy M.S. and Wang L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence- a genomics perspective. Molecular Plant Pathology. 3(5), 371-390.
68. Harakava R. (2005). Genes encoding enzymes of the lignin biosynthesis pathway in Eucalyptus. Genetics and Molecular Biology. 28, 601-607.
69. Wang G.F. and Balint-Kurti P.J. (2016). Maize homologs of CCoAOMT and HCT, two key enzymes in lignin biosynthesis, form complexes with the NLR Rp1 protein to modulate the defense response. Plant Physiology. 171, 2166-2177.

Exploring Plant Defense Responses to Pathogens by RNA-seq Technology

Fatemeh Khelghatibana[1*], Ahmad Sobhani Najafabadi[2], Kobra Moslemkhani[3]

1- PhD in Plant Pathology, Iranian Research Institute of Plant Protection, Plant Protection Lab, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
2- PhD in Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
3- Associate Professor, Seed and Plant Registration and Certification Institute (SPCRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

khelghati50@gmail.com

Abstract

Unlike animals, plants do not have mobile defense cells and their immune systems are not naturally capable of developing and adapting to pathogens. The innate immune system of plants is very complex and organized in two important layers and extensively depends on signaling pathways. Each layer is composed of many components, which timely play their roles, chemical and physical barriers preventing pathogens or oxidative bursts, pathogen-related proteins, and programmed cell death that induced after pathogen recognition are all parts of plant complicated immune system. Transcriptome analysis of the plant pathogen interaction and listing differentially expressed genes (DEGs) shed light on the plant complicated responses to pathogens. The high throughput RNA-seq technology, developed after Next-generation sequencing arrival, is of the most used techniques in DEG analysis. Here, the basics and steps of the RNA-seq technique to study of the plant defense responses were summarized.

Keywords: Plant Immune System, Plant/Pathogen Interaction, RNA-seq, Paired end Reads, DEG Analysis.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.6.6]