

Identification of genes associated with tolerance to apple canker by genome-wide transcriptome analysis

Marjan Ghasemkhani 

*Corresponding author. Assistant Professor, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail address: m.ghasemkhani@kgut.ac.ir

Hilde Nybom 

Professor, Department of Plant Breeding, Balsgård, Swedish University of Agricultural Sciences, Kristianstad, Sweden. E-mail address: hilde.nybom@slu.se

Abstract **Objective**

Neonectria ditissima, the causal agent of fruit tree canker, is one of most destructive diseases of apple trees in producing countries with cool weather. Since it is difficult to control this disease due to the presence of the pathogenic fungus throughout the year, for better understanding of this host–pathogen interaction in order to improve management strategies, a transcriptional analysis of apple gene expression in response to *N. ditissima* was conducted.

Materials and methods

In the present study, we evaluated transcriptome responses to *N. ditissima* by selecting the partially resistant cultivar “Jonathan”. The leaf scars of apple trees were artificially inoculated with suspension of *N. ditissima* and water as control. Then the samples were taken for RNA extraction at three different time points, 5, 15, and 30 days after inoculation. The quality and quantity of the extracted RNA were checked and total RNA was sequenced using Illumina paired-end sequencing and Hiseq2000 sequencer. The quality of the sequence data was done by FastQC software. Then the reads were mapped to apple reference genome by TopHat2 software. Normalization and differential expression analysis of genes were performed with DESeq2. Enrichment analysis of DEGs pathways was done through KEGG software.

Results

Based on GO enrichment and KEGG pathway analyses, it was found that some of the defense response genes were differentially expressed between control and treatment groups. The data provides evidence that apple cultivars inoculated with *N. ditissima* exhibit significant upregulation of defense-related genes and genes involved in detoxification, peroxidase related reactions, phenylpropanoid metabolism. The highest expression level of genes related to defense was observed 30 days after inoculation. It shows that the pathogen needs time to cause infection and cannot spread quickly in the plant tissue.

Conclusions

Identification of candidate genes involved in pathogenicity of *N. ditissima* are involved in lignification, detoxification, phosphorylation and pathogen defense. They are a valuable resource in genetic research and allow us to better understand interaction of fungus and the apple defense system, and may assists in apple canker breeding programs.

Keywords: Defense response, Next-generation sequencing (NGS), *Malus × domestica*, RNA-Seq

Paper Type: Research Paper.

Citation: Ghasemkhani M, Nybom H (2024) Identification of genes associated with tolerance to apple canker by genome-wide transcriptome analysis. *Agricultural Biotechnology Journal* 16 (2), 131-152

Agricultural Biotechnology Journal 16 (2), 131-152. DOI: 10.22103/jab.2024.22780.1543

Received: February 07, 2024.

Received in revised form: April 02, 2024.

Accepted: April 03, 2024.

Published online: May 31, 2024.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant



Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.

© the authors

بررسی بیان ژن‌های دخیل در مقاومت درخت سیب به شانکر اروپایی با استفاده از آنالیز

داده‌های ترانسکریپتوم

مرجان قاسم خانی

*نویسنده مسئول: استادیار، پژوهشگاه علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی و فناوری پیشرفته کرمان، کرمان، ایران.

رایانامه: m.ghasemkhani@kgut.ac.ir

هیلده نیبوم

استاد، گروه اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی سوئد، کیخانستاد، سوئد. رایانامه: Hilde.nybom@slu.se

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۱۸ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۰۱/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۱۵

چکیده

هدف: یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های درختان میوه، بیماری شانکر اروپایی با عامل قارچ بیماری‌زای *Neonectria ditissima*، در کشورهای تولیدکننده سیب با هوای خنک می‌باشد. از آنجایی که کنترل این بیماری به دلیل حضور قارچ بیماری‌زا در طول کل سال دشوار است، این تحقیق به منظور بررسی الگوی بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به این عامل بیماری‌زا در سیب انجام شد که می‌تواند درک بهتر از تعامل بین میزبان و پاتوژن در جهت بهبود استراتژی‌های مدیریتی فراهم کند.

مواد و روش‌ها: بدین منظور رقم نیمه مقاوم سیب ("جاناتان"، منشا نیویورک) با سوسپانسیون قارچ تلقیح داده شد و نمونه‌های شاهد و تلقیح داده شده برای استخراج RNA و توالی‌یابی در سه نقطه زمانی ۵، ۱۵ و ۳۰ روز پس از تلقیح برداشت شدند. پس از کنترل کیفی و کمی RNA کل استخراج شده، توالی‌یابی کل ژنوم به صورت دو سویه توسط شرکت ایلومینا و دستگاه توالی‌یاب Hiseq2000 انجام شد. کنترل کیفیت داده‌ها توسط نرم‌افزار FastQC صورت پذیرفت. سپس خوانش‌ها با استفاده از نرم‌افزار TopHat2 با ژنوم مرجع سیب نقشه‌یابی شدند. نرمال‌سازی و تجزیه و تحلیل ژن‌های با بیان متفاوت با نرم‌افزار DESeq2 و آنالیز غنی‌سازی مسیرهای DEGs با نرم‌افزار KEGG انجام شد.

نتایج: تجزیه و تحلیل‌های غنی‌سازی GO و KEGG در ژن‌های دارای بیان افتراقی (Differentially expressed genes, DEGs)، تعدادی ژن مرتبط با پاسخ دفاعی را شناسایی نمود. در رقم سیب تلقیح شده با *N. ditissima*، تغییرات قابل توجهی در ژن‌های مرتبط با دفاع و ژن‌های دخیل در سم‌زدایی، پراکسیداز و متابولیسم فنیل پروپانویید مشاهده شد. بالاترین

سطح بیان ژن‌های مرتبط با دفاع، ۳۰ روز پس از تلقیح با *N. ditissima* دیده شد. این موضوع می‌تواند بیانگر این باشد که پاتوژن برای ایجاد آلودگی نیاز به زمان دارد و به سرعت نمی‌تواند در بافت گیاه گسترش پیدا کند.

نتیجه‌گیری: ژن‌های شناسایی شده درگیر در بیماری زایی *N. ditissima* دخیل در لیگنین شدن، سم‌زدایی، فسفوریلاسیون و دفاع پاتوژن بوده و منبعی ارز شمند در تحقیقات ژنتیکی هستند و به ما این امکان را می‌دهد تا تعامل پاتوژن با گیاه میزبان را بهتر درک کنیم و می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی کنترل این بیماری مورد استفاده قرار گیرند.

کلیدواژه‌ها: پاسخ دفاعی، توالی یابی نسل جدید، RNA-Seq *Malus × domestica*

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: قاسم‌خانی مرجان، نیوم هیلده (۱۴۰۳) بررسی بیان ژن‌های دخیل در مقاومت درخت سیب به شانکر اروپایی با استفاده از آنالیز داده‌های ترانسکریپتوم. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۶ (۲)، ۱۳۱-۱۵۲.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

سیب گیاهی است چند ساله از تیره گل سرخیان که از لحاظ اقتصادی به عنوان یک محصول مهم کشاورزی در جهان شناخته شده است. در ایران نیز سیب یکی از محصولات پر اهمیت در کشاورزی بوده و به عنوان یکی از منابع اصلی صادرات غیر نفتی کشور در بخش کشاورزی به شمار می‌آید. بیماری شانکر اروپایی یکی از مشکلات جدی اقتصادی در باغبانی می‌باشد. قارچ *Neonectria ditissima* که قبلاً *Neonectria galligena* (آنامورف *Cylindrocarpon heteronema*) نامیده می‌شد، عامل بیماری شانکر است که معمولاً به عنوان یک بیماری شایع در درختان میوه، بخصوص سیب بشمار می‌آید (Carstens et al. 2010; Castlbury et al. 2006). این قارچ در طیف وسیعی از دمای محیط می‌تواند فعالیت داشته باشد، اما ارتباط نزدیکی با آب و هوای مرطوب و خنک دارد و توزیع جغرافیایی آن به شدت با آب و هوای محلی مرتبط است (Kim & Beresford 2012; Beresford & Kim). این پاتوژن در تمام طول سال اسپور جنسی (آسکوسپور) و غیر جنسی (کنیدی) تولید می‌کند، بنابراین منبع آلودگی در تمام طول سال در دسترس است. از آنجایی که در تمام سال نقاط ورود مناسبی برای عفونت بر روی درختان سیب وجود دارد، کنترل این بیماری دشوار است (McCracken et al. 2003). ریشه‌کن کردن این بیماری با قطع کردن بافت‌های آلوده و پوشاندن زخم‌ها با مواد ضدعفونی کننده توصیه شده است. با این وجود، استفاده از قارچ کش‌ها برای کنترل این بیماری معمولاً موفقیت‌آمیز نیست. یک رویکرد جایگزین می‌تواند کشت ارقام مقاوم باشد. در این راستا تلاش‌های متعددی برای یافتن ارقام مقاوم

به شانکر انجام شده است، برخی از مطالعات با استفاده از تلقیح مصنوعی (Garkava-Gustavsson et al. 2013; Zagaja et al. 1971; Linhard Pedersen et al. 2015) و برخی دیگر براساس آلودگی طبیعی (Ghasemkhani et al. 2015) انجام شده و ارقامی با مقاومت نسبی شناسایی شده است (Sasnauskas et al. 2006; Gelvonauskiene et al. 2007). مکانیسم‌های مولکولی بین درخت و عامل بیماری‌زا نامشخص بوده اما در حال شناسایی می‌باشند (Bus et al. 2019).

اصلاح نژاد سنتی برای شناسایی ارقام نسبتاً مقاوم به این بیماری به کندی پیش می‌رود و نتیجه معمولاً پائین تر از سطح انتظار خواهد بود و یا حتی نتیجه‌ای حاصل نمی‌شود. همچنین امکان انتقال صفات مطلوب از سایر ارقام به رقم مورد نظر غیرممکن است. به‌علاوه، مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده در اواخر دهه ۸۰ میلادی روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Barazandeh et al. 2016a; Safaei et al. 2022). ماده ژنتیکی^۱ یک سلول از تعداد زیادی ژن تشکیل شده است که هیچ‌گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در هر زمان تنها تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Barazandeh et al. 2016b). شرایط محیطی که موجود زنده در آن رشد می‌کند می‌تواند تعیین کننده سطح بیان ژن‌ها باشد (Bordbar et al. 2022; Jafari Ahmadabadi et al. 2023) و ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *E. coli* کشف شد (Mohamadipoor et al. 2021; Masoudzadeh et al. 2020). همچنین در هر یک از انواع اندام‌ها تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2021; Shokri et al. 2023). یکی از اقدامات اساسی در به‌نژادی ملکولی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات مهم و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadinejad et al. 2022; Shahsavari et al. 2022). بنابراین در دسترس بودن تکنیک‌های نوین ژنومی می‌تواند اصلاح ارقام را در زمان کوتاه‌تر تا حد زیادی افزایش دهد. این تکنیک‌ها از جمله آنالیز بیان ژن برای تسهیل شناسایی ژن‌های مقاوم در حال توسعه هستند و بررسی الگوی بیان ژن‌ها و مشخص کردن ژن‌های مقاوم به بیماری در این راستا انجام می‌گیرد (Mohammadabadi et al. 2023). بررسی بیان ژن می‌تواند بررسی یک ژن خاص با استفاده از روش‌هایی مثل Real-Time PCR و یا بررسی تعداد زیادی از ژن‌ها باشد (Mohammadabadi et al. 2023). روشی که در حال حاضر رایج است تکنیک RNA-Seq است که رویکردی قدرتمند است و پژوهشگران را قادر می‌سازد تا توالی‌یابی و کمیت رونوشت‌های RNA را در یک محصول تعیین کنند. فناوری RNA-Seq مبتنی بر ایلومینا یک پلت فرم توالی‌یابی با توان عملیاتی بالا است که به افراد اجازه می‌دهد تا به سرعت توالی عمده رونوشت‌های mRNA یک بافت یا اندام خاص از یک گونه را تحت شرایط خاص به دست آورد. یکی از کاربردهای مهم RNA-Seq مطالعه پاسخ‌های گیاه به تنش‌های زنده و غیرزنده است. از آنجایی که ژنوم سیب توالی‌یابی شده است، توالی‌یابی رونوشت‌های RNA (RNA-Seq) در جهت شناسایی و کشف ژن‌های مقاوم سیب

¹ DNA

به این بیماری با در دسترس بودن توالی ژنوم مرجع، با سرعت بیشتری انجام می‌شود. در مطالعه پیشین، RNA-Seq برای شناسایی ژن‌های کاندید در رقم سیب در پاسخ به *Venturia inaequalis* استفاده شد. به طوریکه پنج ژن کاندید شناسایی شدند که حساسیت به بیماری را افزایش می‌دهند: پروتئین ۱، پروتئین شبه متالوتیونین ۳، لیپوکسیژناز، پروتئین انتقال لیپید و پراکسیداز ۳، که بیان آنها در برگ‌های مسن تلقیح نشده افزایش و در برگ‌های مسن تلقیح شده کاهش نشان داد (Gusberty et al. 2013). که و همکاران همچنین با استفاده از روش RNA-Seq، تعدادی ژن در پاسخ به بیماری شانکر والزیی (*Valsa mali*) را در ارقام سیب شناسایی کردند. این ژن‌ها با فعالیت هیدرولاز، کاتابولیک پکتین و بیوستنز متابولیت ثانویه در طول عفونت قارچی مرتبط بودند (Ke et al. 2014). در مطالعه‌ای دیگر، آنالیز ترانسکرپتوم برگ‌های سیب در پاسخ به بیماری لکه قهوه‌ای سیب (*Alternaria alternata*) نشان داد تقریباً بیان ژن‌های مرتبط با فتوسنتز و اکسیداسیون کاهش یافت در حالیکه فاکتورهای رونویسی (مانند *WRKY*، *MYB*، *NAC* و *Hsf*) و ژن‌های درگیر در ساخت دیواره سلولی، سیگنال‌دهی دفاعی و سنتز متابولیت‌های مرتبط با دفاع به طور متفاوتی بیان شدند. از جمله ژن‌های مرتبط با پاتوژنز (Pathogenesis-Related proteins : PRs) و بیوستنز فیل پروپانویید/سیانوآمینو اسید/فلاونوئید در طی این فرآیند فعال شدند (Zhu et al. 2017).

براساس داده‌های موجود، این اولین مطالعه با استفاده از روش RNA-Seq می‌باشد که تعامل بین درخت سیب و پاتوژن *Neonectria ditissima* را مورد بررسی قرار می‌دهد. در مطالعه حاضر، روش RNA-Seq برای تجزیه و تحلیل رونوشت‌های سیب در طول عفونت با *N. ditissima*، به منظور شناسایی ژن‌های مقاوم به بیماری شانکر سیب استفاده گردید. در این مطالعه بررسی بیان ژن‌ها در طیف وسیع در رقم نیمه مقاوم ما را قادر می‌سازد تا فهرستی از ژن‌های کاندید را شناسایی کنیم که در پاسخ به حمله پاتوژن در درختان سیب به طور متفاوتی بیان می‌شوند. این یافته در مطالعه مسیرهای سیگنالی که احتمالاً در مقاومت به شانکر درختان میوه نقش دارند، استفاده خواهد شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در پژوهش حاضر، از درختان یک ساله سیب (*Malus × domestica*) رقم نیمه مقاوم "جاناتان" که روی پایه M9 با سه تکرار (درخت) پیوند زده شد استفاده گردید. این درختان از یک نهالستان تجاری واقع در جنوب کشور سوئد، شهر لوند، (Stångby Nursery School, Lund. 55°44'32.4"N 13°11'47.1"E) که در شرایط آب و هوایی محیط نگهداری می‌شدند، خریداری شدند. رقم مورد نظر براساس مطالعات پیشین که نیمه مقاوم شناسایی شده بود انتخاب گردید (Garkava-Gustavsson et al. 2014). رقم جاناتان یک سیب با اندازه متوسط و شیرین تولید می‌کند و یکی از سیب‌های معروف ایالات متحده می‌باشد. درختان سیب در گلخانه‌ای بدون کنترل دما نگهداری شده و به صورت هفتگی آبیاری می‌شدند و از قارچ کش و کود در طول این مدت استفاده نگردید.

تهیه سوسپانسیون قارچ: برای تلقیح، اسپورودوکسیموم‌های *N. ditissima* که حاوی اسپورهای غیر جنسی (ماکروکنیدی و میکروکنیدی) می‌باشند، از درختان سیبی که به طور طبیعی در باغ (بالسگارد، کشور سوئد، $56^{\circ}6'N$, $14^{\circ}9'E$) آلوده شده بودند، جمع‌آوری شدند. اسپورها ابتدا در محیط آگار (Difco آمریکا) ۱/۵ درصد در دمای اتاق کشت داده شدند. روز بعد، ماکروکنیدی‌های منفرد که به شکل هلالی و چند سلولی بوده (CBS: 139468) روی محیط کشت ۱/۵ درصد آگار (Difco آمریکا) برای تولید اسپورودوکسیا کشت داده شده و سپس محیط کشت تا استفاده بعدی در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. تعداد ماکروکنیدی‌ها با استفاده از هموسیتومتر در زیر میکروسکوپ (Leica DMLB) شمارش شد و سوسپانسیون اسپور به غلظت 1×10^5 کنیدی در میلی‌لیتر تهیه گردید.

روش تلقیح و نمونه برداری: قبل از تلقیح، جوانه زنی موفق اسپورهای تولید شده طبق مطالعات پیشین تایید شد (Ghasemkhani et al. 2015). چهار جوانه از هر درخت به شماره‌های ۱۱، ۱۴، ۱۷ و ۲۰ از راس شاخه با اسکالپر (Scalpel) بریده شدند. سپس محل برش جوانه‌ها با ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور (1×10^5 کنیدی در میلی‌لیتر) تلقیح داده شد. درخت‌های شاهد با آب مقطر تلقیح داده شدند. هنگامی که سوسپانسیون به طور کامل در بافت درخت نفوذ کرد، زخم‌ها با وازلین (Vaseline® ACO سوئد) پوشانده شدند. درختان پس از تلقیح در گلخانه با دمای محیط نگهداری شدند. سپس از چوب و پوست اطراف نواحی آلوده شده‌ی سه جوانه هر درخت در سه نقطه زمانی مختلف، ۵، ۱۵ و ۳۰ روز پس از تلقیح، نمونه برداری شد. قبل از نمونه برداری وازلین با استفاده از دستمال کاغذی برداشته شد. نمونه‌ها پس از نمونه برداری بلافاصله در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند و تا استخراج RNA در دمای $-80^{\circ}C$ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در این تحقیق هر درخت به عنوان یک تکرار بیولوژیکی استفاده گردید. برای هر نقطه زمانی (۵، ۱۵ و ۳۰) سه تکرار بیولوژیکی (۳ درخت)، و دو تلقیح (*N. ditissima* و آب) در نظر گرفته شد. در مجموع ۱۸ درخت سیب ($3 \times 3 \times 2$) برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت.

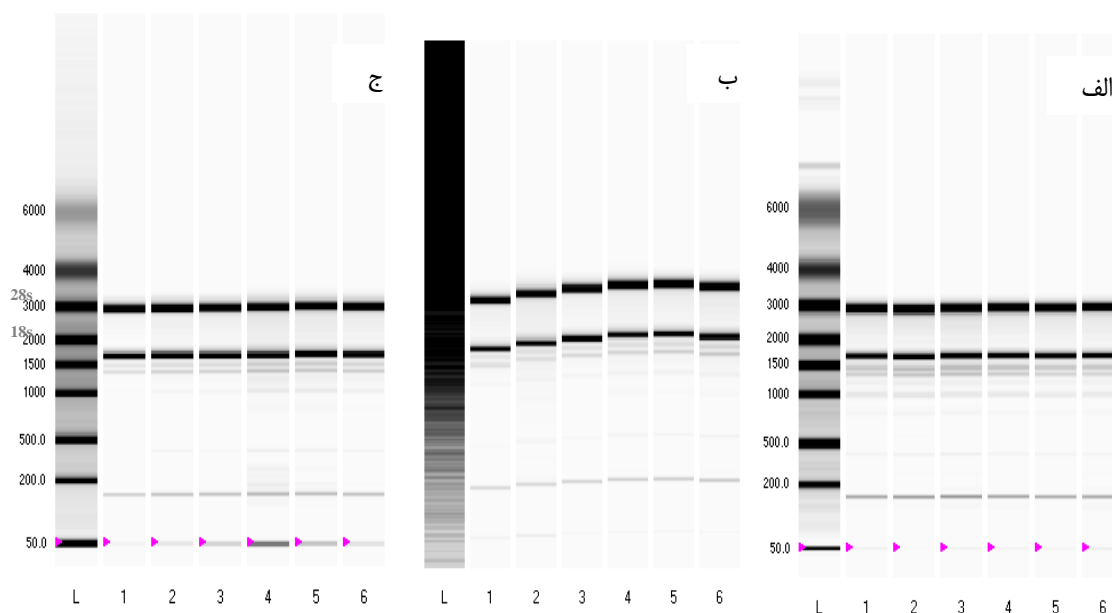
جداسازی RNA و آماده سازی کتابخانه برای Illumina HiSeq: سه جوانه نمونه برداری شده از هر درخت با هم ادغام شدند و RNA کل با استفاده از کیت (RNeasy Micro (QIAGEN, Cat. No. / ID: 74104) طبق پروتکل استخراج شد. خلوص و غلظت RNA با استفاده از نانودراپ (Wilmington آمریکا) و یکپارچگی RNA جدا شده با استفاده از یک دستگاه الکتروفورز تمام اتوماتیک (Bio-Rad Laboratories, Hercules آمریکا) اندازه‌گیری شد. این دستگاه از فناوری میکروسیال LabChip برای خودکار کردن الکتروفورز پروتئین و اسید نوکلئیک استفاده می‌کند و جداسازی، تشخیص و تجزیه و تحلیل داده‌ها را در یک پلت فرم واحد ادغام می‌کند. نمونه‌های RNA کل (۲۵۰ نانوگرم در میکرولیتر) به NGI (National Genomics Infrastructure, Scilifelab سوئد) ارسال شدند و ۱ میکروگرم از RNA کل برای تهیه کتابخانه استفاده گردید.

پردازش داده‌های RNA-Seq: کنترل کیفیت داده‌ها جهت حذف بازهایی که کیفیت پایین دارند توسط نرم‌افزار FastQC (V0.11.2) انجام شد (Andrews, 2010). علیرغم کیفیت بالای کلی FastQC، مشخص شد که برخی از داده‌ها همچنان حاوی توالی آدپتور ایلومینا هستند که پردازش خوانش‌ها با نرم‌افزار Trimmomatic (V0.32) انجام شد (Boger et al. 2014). خوانش‌های با کیفیت پائین و توالی‌های حاوی آدپتور حذف شدند. در این آزمایش کیفیت $Q > 30$ در نرم‌افزار Trimmomatic در نظر گرفته شد. خوانش‌های پیرایش شده و فیلتر شده با استفاده از نرم‌افزار TopHat2 (V2.0.13) (Trapnell et al. 2009) با ژنوم مرجع سیب (Velasco et al. 2010) و قارچ *Nectria haematococca* که به خانواده *N. ditissima* تعلق دارد، نقشه‌یابی شدند (Coleman et al. 2009). تعداد ۲۰۱۸۰ خوانش قارچ شناسایی شد و از توالی‌یابی حذف شدند. تعداد خوانش‌ها در هر ژن با نرم‌افزار HTseq-count (V0.6.1) (Anders et al. 2014) محاسبه شد. نرمال‌سازی و تجزیه و تحلیل بیان متفاوت ژن‌ها با DESeq2 انجام شد (Anders & Huber 2010; Love et al. 2013). آستانه کشف اشتباه (False Discovery Rate, FDR 0/05) تعیین گردید. آنالیز کلاستر با استفاده از نرم‌افزار CIMminer انجام شد. آنالیز غنی‌سازی مسیرهای ژن‌های دارای بیان افتراقی (DEGs) از طریق نرم‌افزار KEGG صورت پذیرفت. هم‌چنین جهت بررسی بیش‌تر GO‌های به دست آمده و رسم *pathway*ها و قابل مشاهده سازی آن‌ها از وب سایت AgriGO استفاده شد (DU et al. 2010).

نتایج

خلاصه داده‌های RNA-Seq: به طور کلی ۲۴ نمونه از بافت تلقیح شده با *N. ditissima* و آب با استفاده از یک رقم نیمه مقاوم سیب با سه تکرار بیولوژیکی در سه نقطه زمانی پس از تلقیح، برای استخراج RNA جمع‌آوری و برای توالی‌یابی ارسال شد. در تجزیه تعیین خلوص و کمیت RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ، نمونه‌هایی که نسبت‌های جذب آنها $> 1/8$ nm بود، انتخاب شده و جهت توالی‌یابی ارسال گردیدند. در بررسی کیفیت RNA با استفاده از دستگاه تمام اتوماتیک Experion دو باند ۱۸S و ۲۸S مشاهده شد که نشان دهنده کیفیت RNA استخراج شده بود (شکل ۱). یکی دیگر از شاخص‌های استفاده شده در بررسی کیفیت RNA استخراج شده عدد RQI (RNA quality indicator) بود. شاخصی برای بررسی میزان تجزیه شدن RNA می‌باشد که محدوده بین ۱ تا ۱۰ دارد. اعداد بزرگ‌تر نشان دهنده کیفیت بالاتر و تخریب کمتر RNA استخراج شده می‌باشند. کلیه نمونه‌های ارسال شده جهت توالی‌یابی نمونه‌های دارای RQI بزرگ‌تر از ۹/۸ بودند. تقریباً ۲۶۳ میلیون خوانش به صورت paired-end به دست آمد که به طور متوسط ۱۰/۸ میلیون خوانش به صورت paired-end در هر نمونه بود. نتایج بررسی کیفیت خوانش‌ها با نرم‌افزار FastQC نشان داد که خوانش‌ها کیفیت لازم برای انجام تجزیه‌ها را دارند. با این حال برای به دست آوردن حداکثر کیفیت، خوانش‌های با کیفیت نامطلوب با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic

حذف شد (Bløger et al. 2014). در مجموع ۲۳۰ میلیون خوانش Illumina (۸۸ درصد) از فیلتر کیفیت عبور کردند. نتایج منطبق کردن خوانش‌های پیرایش شده با ژنوم مرجع سیب با استفاده از نرم افزار Tophat2 نشان داد که درصد بالایی از خوانش‌ها (۲۰۶ میلیون از کل خوانش‌ها) بر ژنوم مرجع منطبق شدند (Velasco et al. 2010).



شکل ۱. کنترل کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه تمام اتوماتیک Experion. الف (ب و ج) به ترتیب نمونه‌های RNA استخراج شده ۵، ۱۵ و ۳۰ روز بعد از آلودگی، اعداد خط افقی نمودار به شرح: ۱، ۲ و ۳ درخت‌های تلقیح شده با *N. ditissima* و ۴، ۵ و ۶ درخت‌های تلقیح شده با آب

Figure 1. RNA quality control using an Experion™ Automated Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). A, B and C: RNA extraction at 5, 15 and 30 days after inoculation, respectively. The numbers of horizontal line are as follows: 1, 2 and 3: inoculation of trees with *N. ditissima* and 4, 5 and 6 inoculation of trees with water.

دینامیک رونویسی کلی: براساس آنالیز تجزیه مولفه‌های اصلی با استفاده از نرم افزار R نسخه ۳،۳،۱، تفاوت آشکاری بین نمونه‌های تلقیح شده با *N. ditissima* و تلقیح شده با آب در ۵ روز بعد از آلودگی مشاهده نشد و در ۱۵ و ۳۰ روز بعد از آلودگی تفاوت معنی داری در ژن‌های بیان شده مشاهده گردید. آستانه کشف اشتباه (FDR) ۰/۰۵ به عنوان آستانه برای قضاوت در مورد اهمیت تفاوت بیان ژن در سه نقطه زمانی مختلف استفاده شد. حداقل تعداد DEGs در اولین نقطه زمانی مشاهده شد. در حالیکه بیشترین تعداد DEGs در نقطه زمانی سوم (۳۰ روز بعد از آلودگی) مشاهده و ۴۱۳۳ ژن بیان شدند (جدول ۱).

نتایج آنالیز غنی‌سازی نشان داد ژن‌های بیان شده در ۱۵ و ۳۰ روز بعد از آلودگی در سه گروه اصلی: فرآیندهای بیولوژیک، عملکردهای مولکولی و اجزای سلولی طبقه‌بندی شدند. براساس نتایج ژن‌های مربوط به گروه عملکرد مولکولی به ۱۱ زیرمجموعه، اجزای سلولی به ۶ زیربرده و فرآیند بیولوژیکی به ۱۲ زیربرده تقسیم شدند. بررسی‌ها نشان داد که بیشتر ژن‌های دارای بیان افتراقی مربوط به گروه فرآیندهای بیولوژیک است که خود به چندین زیر گروه تقسیم شده است و زیر گروه‌های اصلی مربوط به فرآیندهای متابولیک و سلولی می‌باشند. در گروه عملکردهای مولکولی زیر گروه‌های اصلی در پروسه‌های اتصال و فعالیت‌های کاتالیتیکی قرار گرفتند (شکل ۲). فعالیت‌های کاتالیتیکی سبب تسریع یا کاهش فعل و انفعالات شیمیایی می‌شوند.

جدول ۱. ژن‌های متفاوت بیان شده در سه نقطه زمانی در رقم نسبتاً مقاوم جانانان ($FDR < 0.05$)

Table 1. Differentially express genes at three time points in the partially resistant cultivar (FDR<0.05)

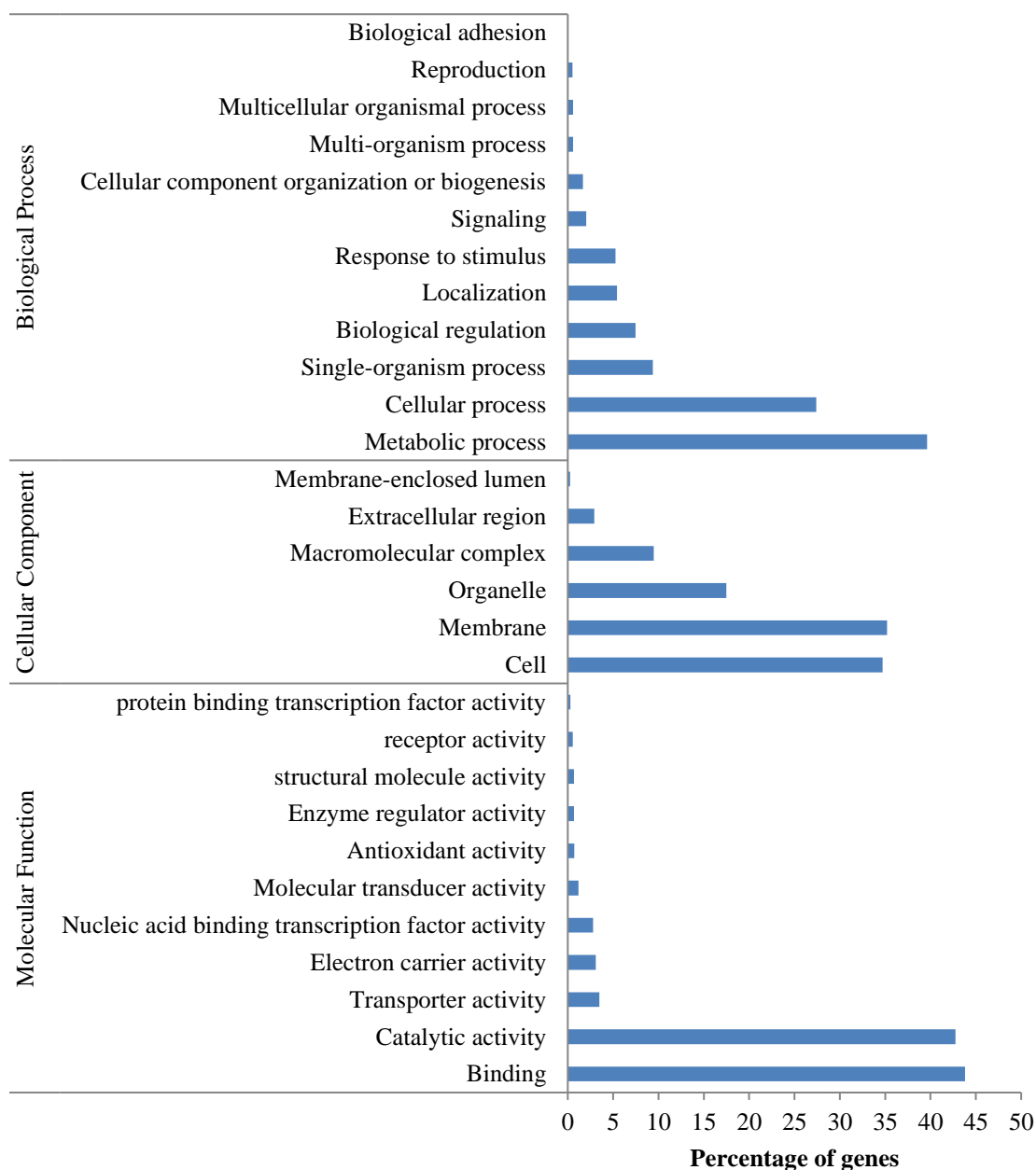
۳۰ روز بعد از آلودگی		۱۵ روز بعد از آلودگی		۵ روز بعد از آلودگی		جانانان "Jonathan"
30 days after inoculation		15 days after inoculation		5 days after inoculation		
Down regulated genes	Upregulated genes	Down regulated genes	Upregulated genes	Down regulated genes	Upregulated genes	
1738	2395	1419	1887	0	1	

در شکل ۳ خلاصه ای از برخی ژن‌های شناسایی شده در فرآیندهای مختلف سلولی ارائه شده است. برطبق نتایج، تعدادی از ژن‌های شناسایی شده در فرآیند مرگ سلولی (Apoptosis) نقش داشتند. برخی از این ژن‌ها با پاسخ دفاعی مرتبط بودند که افزایش بیان داشتند، از جمله ژن *MLO12* کد کننده پروتئین مقاومت به کپک، دو ژن *Bet v 1* که پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (Pathogenesis) را کد می‌کنند، ژن *ACT7*، *NPR3* در پاسخ به زخم، *BAK1* ژن کد کننده پروتئین کیناز اختصاصی سرین/ترونین (serine/threonine protein kinase Leu-rich receptor) و دو ژن *ATGSTU19* که در پاسخ به ماده سمی و فرآیند کاتابولیک سم نقش داشتند. چندین ژن در انتقال الکترون دخیل بودند که افزایش بیان داشتند، از جمله دو ژن *CYP71A25* (cytochrome P450)، دو ژن *CYP71A26* (cytochrome P450) که اتصال اکسیژن را رمزگذاری می‌کنند، *ATBCB*، *ATPA2*، glycine-rich proteins و یک ژن (*MDP0000264519*) که پروتئین پروکسیداز رو کد می‌کنند. علاوه بر این، دو ژن *DMR6* افزایش بیان داشتند که فعالیت اکسیدوردکتاز را کدگذاری می‌کنند و در فرآیند بیوستنز فلاونوئیدی دخیل هستند. ژن *TT10* نیز شناسایی گردید که پروتئینی شبیه پلی فنل اکسیدازهای شبه لاکاز (*laccase-like polyphenol oxidases*) را کد می‌کند و در بیوستنز لیگنین و فلاونوئیدها نقش دارد. ژن‌های *PAL1* و *PAL2* نیز تا حدی افزایش بیان داشتند

و در فرآیند کاتابولیک L- فنیل آلانین نقش داشتند. برخی از ژن‌ها در پروسه متابولیک نقش داشتند، از جمله *ELI3-1*، *GT/UGT74F2*، *ATGSTF13* و *CAD1*. ژن *ATGSTU8* افزایش بیان بالایی نشان داد که در فعالیت گلوکوتایون ترانسفراز نقش داشت. برخی از ژن‌های دخیل در فسفوریلاسیون اسید آمینه مانند *RLK1* با تلقیح ارقام سیب با *N. ditissima* فعال شدند.

بحث

بیشترین افزایش بیان ژن‌ها ۳۰ روز بعد از تلقیح مشاهده شد و عمدتاً ژن‌های دخیل در پاسخ‌های دفاعی مختلف مانند پروتئین مقاومت به بیماری، پراکسیداز، استرس اکسیداتیو و بیوسنتز فلاونوئید شناسایی شدند. در اولین زمان نمونه برداری، ۵ روز بعد از آلودگی، هیچ ژنی در پاسخ به بیماری شناسایی نگردید و این بیانگر این موضوع می‌باشد که پاسخ درخت سیب به عفونت قارچی توسط *N. ditissima* به زمان بیشتر از ۵ روز نیاز دارد تا تغییراتی در بیان ژن‌ها مشاهده شود. چندین ژن شناسایی شده در مرگ سلولی و پاسخ‌های دفاعی نقش داشتند. فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی با مکانیسم‌های بیوشیمیایی وابسته به انرژی و ویژگی‌های مورفولوژیکی متمایز مشخص می‌شود. مرگ سلولی به عنوان یک جزء ضروری از فرآیندهای مختلف از جمله توسعه و عملکرد مناسب سیستم ایمنی و مرگ سلولی القا شده با مواد شیمیایی در نظر گرفته می‌شود (Elmore 2007; Carneiro et al. 2020). در این مطالعه، *RPM1* که در مرگ سلولی نقش داشت، ۳۰ روز بعد از آلودگی افزایش بیان نشان داد. این موضوع بیانگر این است که ژن‌های دخیل در مرگ برنامه‌ریزی شده سلول در مراحل اولیه آلودگی فعال نمی‌گردند و زمانی این اتفاق رخ می‌دهد که گیاه آن را به عنوان روشی حفاظت شده جهت حذف سلول‌های تخریب شده یا آلوده به قارچ بکار می‌گیرد. مطالعات پیشین بیان داشتند که ژن *RPM1* باعث ایجاد مقاومت علیه باکتری *Pseudomonas syringae* از طریق افزایش بیان ژن *AvRpm1* یا *AvB* می‌شود (Wang et al. 2020). برخی از ژن‌ها که توسط عفونت قارچی القا شده بودند، در رده سیستم دفاعی طبقه‌بندی شدند، به عنوان مثال *MLO12*، *ACT7*، *Bet v 1*، *NPR3* و *BAK1*. پروتئین‌های *MLO* پپتیدهای غنی از لوسین (۹ تا ۱۳ درصد) هستند (Singh et al. 2012) و طبق مطالعات انجام شده پروتئین‌های غنی از لوسین نقش مهمی در مسیرهای انتقال پیام پاسخ دفاعی ایفا می‌کنند (Kemmerling et al. 2007; Kędzierski et al. 2004; Torii 2004). ایجاد جهش در ژن *SIM1* با تکنیک CRISPR/Cas9 باعث مقاومت به بیماری سفیدک پودری در گیاه گوجه فرنگی در یک سیستم غیر تراریخته شده است (Nekrasov et al. 2017).

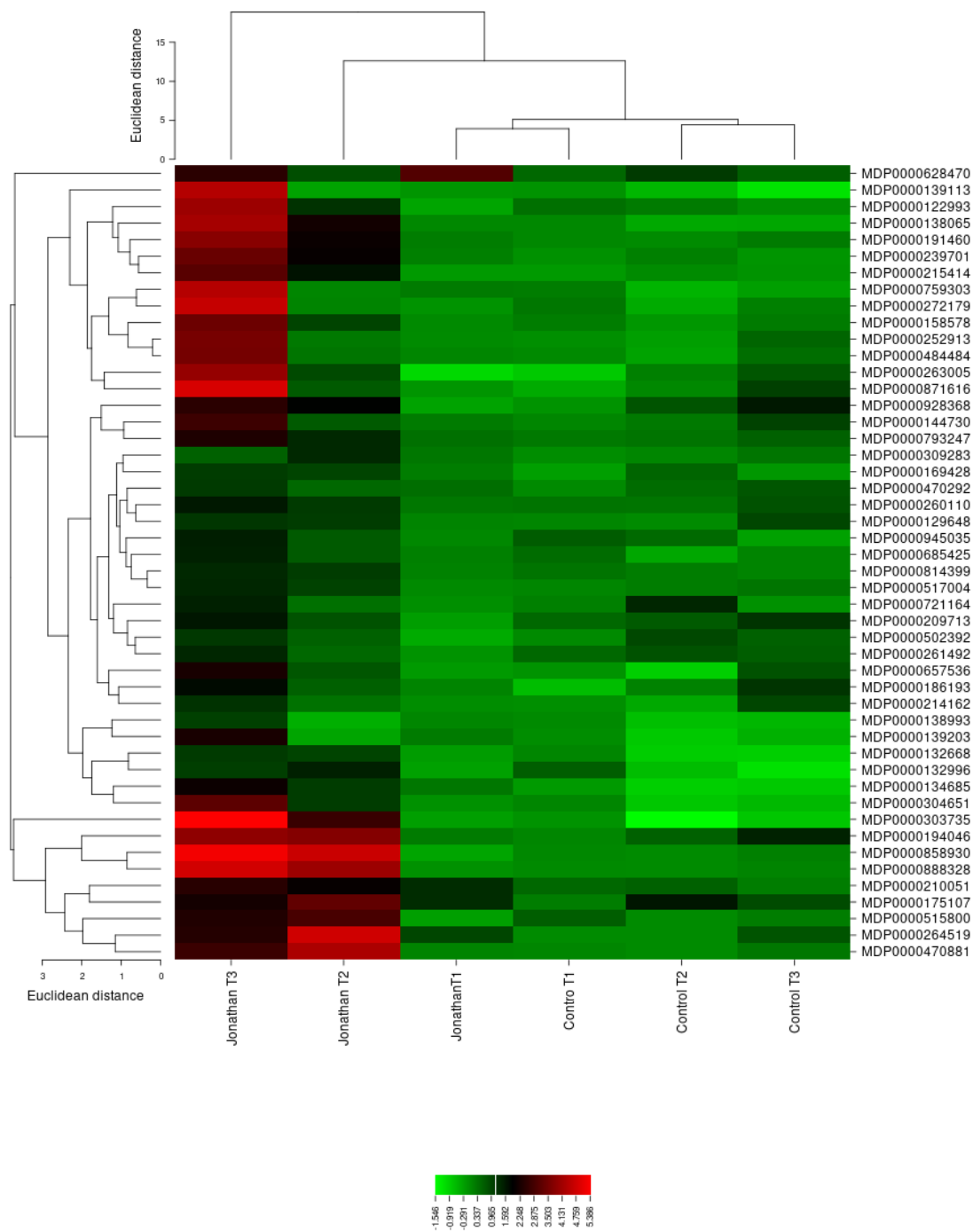


شکل ۲. نمودار مربوط به طبقه بندی عملکردی ژن های بیان شده متفاوت در سطح معنی داری ۰/۰۵ که در صد مشارکت کننده در هر یک از گروه های GO بر روی محور افقی و فرآیندهای بیولوژیک، عملکردهای مولکولی و اجزای سلولی هر یک از آنها بر روی محور عمودی نمایش داده شده است.

Figure 2. Functional classification of differentially expressed genes at a significance level of $FDR < 0.05$, with the percentage of participants in each of the GO groups on the horizontal axis, and biological processes, molecular functions and cellular components showed on the vertical axis.

بنابراین طبق یافته‌ای جدید از دست دادن عملکرد ژن‌های *MLO* یک استراتژی بالقوه جهت ایجاد مقاومت به سفیدک پودری در گونه‌های زراعی می‌تواند باشد و این امکان وجود دارد که خاموشی این ژن باعث فعال شدن سایر ژن‌های درگیر در مقاومت می‌شود. هر چند مطالعات پیشین نشان دادند ژن‌های *MLO* باعث ایجاد مقاومت در گیاهان زراعی مانند جو به سفیدک پودری شدند (Atzema 1998). ژن *Bet v 1* ۱۵ و ۳۰ روز بعد از آلودگی افزایش بیان نشان داد. این ژن متعلق به خانواده پروتئین‌های مرتبط با بیماری زایی (*PR-10*) در گیاهان دو لپه‌ای است. طبق گزارش‌ها پروتئین‌های مرتبط با بیماری زایی (*PR*) در طی عفونت به عنوان بخشی از مقاومت اکتسابی سیستمیک (Systemic acquired resistance, SAR) که از پاسخ ایمنی ویژه گیاهان می‌باشد در گیاهان القا می‌شوند (Schenk et al. 2009). *PR-10* جز آلرژن‌های گیاهی هستند و سنتز آنها در پاسخ به عفونت افزایش می‌یابد، که نقش احتمالی آنها محافظت گیاه در برابر پاتوژن‌ها است (Puehringer et al. 2003). در مطالعه پیشین بین بیان پروتئین *PR-10* و مقاومت به بیماری *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* در انگور ارتباط معنی‌داری مشاهده گردید (Robert et al. 2001). همچنین این پروتئین به عنوان بخشی از سیستم دفاعی سورگوم در برابر پاتوژن‌های قارچی در برگ‌ها فعال می‌شود (Katile et al. 2010). مکانیسم‌های دفاعی زیادی، از جمله پروتئین‌های *PR*، در ارقام سیب در زمان آلودگی فعال می‌شوند، با این حال تاخیر در بیان تعدادی از ژن‌های دخیل در مسیرهای متابولیسم فنیل پروپانویید در رقم‌های حساس سیب مشاهده شده بود (Venisse et al. 2002). در رقم "گلدن دلشیز" دو زیر گروه ژن *PR-10* و به ویژه زیر گروه *APa*، در واکنش به بیماری لکه سیاه سیب، *V. inaequalis*، فعال شدند (Chevalier et al. 2008). یکی از همولوگ‌های *Bet v 1* موجود در میوه سیب، *Mal d 1* می‌باشد که مسئول حساسیت در جمعیت انسانی به ویژه در شمال اروپا است (Nybom et al. 2013). احتمالاً آلودگی توسط برخی بیماری‌ها مانند شانکر درختان سیب، ممکن است میزان علائم حساسیت ناشی از برخی از ایزوفرم‌های پروتئین *Mal d 1* در میوه‌های سیب را افزایش دهد. ایزوفرم‌ها، پروتئین‌هایی می‌باشند که از یک ژن منشا گرفته اند اما دارای توالی اسیدآمینو متفاوت با عملکرد مشابه هستند.

در این مطالعه، ژن‌های آنتی‌اکسیدان دخیل در رونویسی، مانند فنیل آلانین آمونیاک لیاژ (*PAL*)، پراکسیدازها و ژن‌هایی که احتمالاً در تولید متابولیت‌های ضد میکروبی نقش دارند، مانند سیتوکروم P450، شناسایی شده‌اند. ژن رمزکننده آنزیم فنیل آلانین آمونیاک لیاژ (*PAL*) در دفاع از گیاهان در برابر پاتوژن‌ها نقش دارد و اولین گام در بیوسنتز فنیل پروپانوییدها که مسئول تولید لیگنین است را کاتالیز می‌کند (Dixon et al. 2002). ژن *PAL* در بیوسنتز طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه مانند فلاونوئیدها و فیتوالکسین‌های فورانوکومارین نقش دارد. این ترکیبات برای رشد طبیعی و در پاسخ به استرس‌های محیطی مهم هستند. براساس نتایج بیان ژن‌های *PAL1* و *PAL2* ۳۰ روز بعد از آلودگی مشاهده شد. مطالعات قبلی افزایش بیان ژن *PAL* را در آواکادو تلقیح شده با *Colletorichum gloeosporoides* (Beno-Moualem & Prusky 2000) و در میوه کیوی در پاسخ به عفونت *Botrytis cinerea* گزارش کردند (McLeod & Poole 1994).



شکل ۳. نمودار Heatmap ژن‌های کاندید بالقوه درگیر در پاسخ به *Neovectria ditissima*

Figure 3. Heatmap presenting the expression level of potential candidate genes involved in resistance against *Neovectria ditissima*

بیان متفاوتی در ژن‌های *PAL* در ریشه‌های گوجه‌فرنگی تلقیح شده با *Verticillium dahliae* توسط Gayoso et al. (2010) مشاهده شد و نشان دادند که ژن‌های *PAL2* و *PAL6* احتمالاً در لیگنین‌سازی نقش دارند در حالی که مابقی ژن‌های *PAL* در سایر فرآیندهای بیولوژیکی دخیل هستند. همچنین افزایش بیان ژن *PAL* زمانی گزارش شد که برگ‌های سیب به بیماری لکه سیاه سیب آلوده شده بودند (Petkovsek et al. 2011; Schovankova & Opatova 2011). بنابراین به احتمال زیاد، افزایش بیان ژن *PAL* به کاهش آلودگی *N. ditissima* در درختان سیب کمک می‌کند.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که یکی از ژن‌های پراکسیداز (MDP0000215414) ۱۵ روز بعد از تلقیح بیان شد، همچنین ژن دیگری (MDP0000264519) در ۱۵ و ۳۰ روز بعد از تلقیح افزایش بیان نشان داد. براساس مطالعات گذشته افزایش فعالیت پراکسیداز با مقاومت سیستمیک در تنباکو در پاسخ به عفونت ویروس موزاییک تنباکو مرتبط است (Simons & Ross 1970). این موضوع بیانگر اهمیت پراکسیدازها در ایجاد مقاومت علیه عوامل بیماری‌زا می‌باشد. پراکسیدازهای گیاهی (POX) متعلق به خانواده بزرگی از آنزیم‌ها هستند که پراکسید هیدروژن را به آب تبدیل می‌کنند و در مسیر کاتالیز خود باعث اکسید شدن بسیاری از سوبستراهای آلی و غیر آلی می‌شود که همه آنها برای سنجش فعالیت آنزیم قابل استفاده هستند. اما سوبسترای اختصاصی آن همچنان پراکسید هیدروژن (H_2O_2) است و ممکن است نقش مهمی در مکانیسم مقاومت داشته باشند. پراکسیدازهای گیاهان نقش‌های متعددی از جمله دخالت در بیوسنتز لیگنین، فرآیندهای مرتبط با رشد، متابولیسم اکسین و پاسخ به تنش‌های محیطی دارند (Veitch 2004). در تمامی فرآیندهای فیزیولوژیک و تغییرات فنولوژیک گیاه، پراکسید هیدروژن که ماده‌ای سمی بوده در بافت‌ها تولید می‌شود و پراکسیدازها سلول را از این ماده پاک می‌نماید.

در این مطالعه ژن *TT10*، ۳۰ روز بعد از تلقیح افزایش بیان نشان داد. *TT10* پروتئینی را کد می‌کند که شباهت زیادی به پلی‌فنل اکسیدازهای شبه لاکاز دارد و در پلیمریزاسیون اکسیداتیو فلاونوئیدها نقش دارد و به عنوان یک فلاونوئید اکسیداز از نوع لاکاز عمل می‌کند (Pourcel et al. 2005). این ژن ارتباط نزدیکی با سنتز لیگنین و فرآیند لیگنیفیکاسیون در گیاهان دارد. سیتوکروم‌های (CYPs) P450 متعلق به بزرگترین خانواده پروتئین‌های گیاهی هستند و در سم‌زدایی و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه نقش دارند (Morant et al. 2003). مطالعه حاضر نشان داد که سطح بیان ژن‌های *CYP71A25* و *CYP71A26* در پاسخ به تلقیح *N. ditissima* ۱۵ و ۳۰ روز بعد از تلقیح افزایش یافت. سیتوکروم P450 در پاسخ دفاعی گیاه نقش دارد (Trognitz et al. 2002).

چندین ژن در فسفوریلاسیون اسید آمینه (اضافه شدن یک گروه فسفات به پروتئین یا سایر مولکول‌های آلی) از جمله *RKFI*، *RLK1* و پروتئین کیناز با توالی‌های تکراری غنی از لوسین (*LRPKm1*) افزایش بیان نشان دادند. *LRPKm1* احتمالاً در پاسخ‌های دفاعی مشارکت دارد. به طوری که میزان بیشتری از رونوشت‌های پروتئین کیناز را در رقم مقاوم سیب "فلورینا" تلقیح داده شده با *Venturia inaequalis* در مقایسه با رقم حساس سیب "گلدن دلشز" مشاهده شد (Komjanc et al. 1999).

در مطالعات گذشته خاموش کردن ژن *LysM RLK1* منجر به مسدود شدن اکثر ژن‌های پاسخ دهنده به الیگوساکارید (کیتین) شده و باعث ایجاد حساسیت به پاتوژن‌های قارچی در آرابیدوپسیس شد (Wan et al. 2008).

ژن‌های *NPR3* و *BAK1* نیز افزایش بیان نشان دادند. ژن *NPR3* یک گروه از گیرنده‌های هورمون دفاعی گیاه (اسیدسالیسیلیک) می‌باشد و بیان ژن‌های درگیر در پاسخ‌های دفاعی گیاه (*PR*) که توسط اسیدسالیسیلیک تحریک می‌شوند را تنظیم می‌کند (Wang et al. 2016). ژن *BAK1* یک ژن پیش از مرگ سلولی است و در سیستم دفاعی گیاهان می‌تواند دارای اهمیت باشد.

نتیجه گیری: مطالعه حاضر شناسایی و توصیف گسترده‌ای از بیان ژن‌ها در رقم نیمه مقاوم سیب "جاناتان" در پاسخ به *N. ditissima* را ارائه داده نمود. در این بررسی ژن‌هایی توصیف شدند که سطح بالای بیان آن‌ها با استفاده از فناوری RNA-Seq شناسایی شد. بیان ژن‌های دارای بیان افتراقی دخیل در مقاومت در سه نقطه زمانی مورد بررسی قرار گرفتند و بیشترین تعداد ژن‌ها ۳۰ روز بعد از آلودگی مشاهده گردید. ژن‌های کلیدی شناسایی شده از جمله *BAK1* و *Bet v 1*, *ACT7*, *NPR3*, *MLO12* در پاسخ‌های دفاعی، ژن‌های *ATGSTU19* در فرآیند سم‌زدایی و *RPM1* در مرگ سلولی نقش داشتند. همچنین ژن‌های *PAL2*, *PAL1*, *TT10*, *DMR6* در فرآیند لیگنین شدن و بیوسنتز فلاونوئیدها شناسایی گردیدند. در مجموع، نتایج مطالعه حاضر بیانگر این موضوع است که درختان سیب واکنش دفاعی متنوع و پیچیده‌ای به این پاتوژن نشان می‌دهند. همچنین این نتایج مبنای علمی برای بررسی بیشتر جهت درک عمیق‌تر مکانیسم‌های زیست‌شناسی و بیماری‌زایی این پاتوژن در ارقام مختلف سیب را هموار می‌سازد و امکان بکارگیری استراتژی‌های جدید برای مدیریت بیماری را فراهم می‌نماید.

سپاسگزاری: این پژوهش در قالب طرح پژوهشی شماره ۷/ص/۰۲/۸۶۹ با استفاده از اعتبارات پژوهشی پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان انجام شده است، تشکر می‌گردد.

منابع

- جعفری احمدآبادی سید علی اصغر، عسکری‌همت حشمت‌اله، محمدآبادی محمدرضا (۱۴۰۲) تاثیر شاهدانه بر بیان ژن *DLK1* در بافت قلب بره‌های کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۱)، ۲۱۷-۲۳۴.
- شکری سمیرا، خضری امین، محمدآبادی محمدرضا، خیرالدین حمید (۱۴۰۲) بررسی بیان ژن *MYH7* در بافت‌های ران، دست و راسته بره‌های پرواری نژاد کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۲)، ۲۱۷-۲۳۶.

محمدآبادی محمدرضا، گلکار افروز، عسکری حسنی مجید (۱۴۰۲) اثر رازیانه (*Foeniculum vulgare*) بر بیان ژن فاکتور ۱ رشد شبه انسولین در بافت شکمبه گوسفند کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۴)، ۲۳۹-۲۵۶.

References

- Atzema, JL (1998) Durability of *MLO* resistance in barley against powdery mildew caused by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. ETH Zurich.
- Anders S, Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11, R106.
- Anders S, Pyl PT, Huber W (2014) HTSeq—A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinform* btu638.
- Andrews S (2010) FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Reference Source.
- Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Nezamabadipour H (2016a) Predicting CpG Islands and Their Relationship with Genomic Feature in Cattle by Hidden Markov Model Algorithm. *Iran J Appl Anim Sci* 6 (3), 571-579.
- Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Nezamabadipour H (2016b) Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features. *Czech J Anim Sci* 61, 487.
- Beno-Moualem D, Prusky D (2000) Early events during quiescent infection development by *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. *Phytopathology* 90, 553-9.
- Beresford RM, Kim KS (2011) Identification of regional climatic conditions favorable for development of European canker of apple. *Phytopathology* 101, 135-46.
- Bolger A, Giorgi F (2014) Trimmomatic: A Flexible Read Trimming Tool for Illumina NGS Data. URL <http://www.usadellab.org/cms/index.php>.
- Bordbar F, Mohammadabadi M, Jensen J, et al. (2022) Identification of candidate genes regulating carcass depth and hind leg circumference in simmental beef cattle using Illumina Bovine Beadchip and next-generation sequencing. *Animals* 12 (9), e1103.
- Bus VGM, Scheper RWA, Walter MR et al. (2019) Genetic mapping of the European canker (*Neonectria ditissima*) resistance locus *Rnd1* from *Malus* 'Robusta 5'. *Tree Genet* 15, 1-13.
- Carneiro, Benedito A. Wafik S. El-Deiry (2020) "Targeting apoptosis in cancer therapy." *Nat Rev Clin Oncol* 17.7, 395-417.
- Carstens E, Van Niekerk JM, Smit WA, Fourie PH (2010) Resolving the status of *Neonectria ditissima* in South Africa. *Australas. Plant Pathol* 39, 43-5.

- Castlebury LA, Rossman AY, Hyten AS (2006) Phylogenetic relationships of *Neonectria/Cylindrocarpon* on Fagus in North America. *Can J Bot* 84, 1417-33.
- Chevalier M, Parisi L, Gueye B et al. (2008) Specific activation of *PR-10* pathogenesis-related genes in apple by an incompatible race of *Venturia inaequalis*. *Biol Plant* 52, 718-22.
- Coleman JJ, Rounsley SD, Rodriguez-Carres M et al. (2009) The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. *PLoS genet* 5, e1000618.
- Dixon RA, Achnine L, Kota P et al. (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Mol Plant Pathol* 3, 371-90.
- Du Z, Zhou X, Ling Y et al. (2010) AgriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Res* pp.64-70.
- Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol pathol* 35, 495-516.
- Garkava-Gustavsson L, Ghasemkhani M, Zborowska A, Englund JE, Lateur M et al (2014). Approaches for evaluation of resistance to European canker (*Neonectria ditissima*) in apple. 29th International Horticultural Congress (IHC2014), Aug. 17-22, 2014. Brisbane, Australia, pp. 75-82.
- Garkava-Gustavsson L, Zborowska A, Sehic J et al. (2013) Screening of apple cultivars for resistance to european canker, *Neonectria ditissima*. *Acta Hort* 976, 529-36.
- Gayoso C, Pomar F, Novo-Uzal E, Merino F, De Ilárduya ÓM (2010) The Ve-mediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H₂O₂, peroxidase and lignins and drives *PAL* gene expression. *Bmc Plant Biol* 10, 232.
- Ghasemkhani M, Liljeroth E, Sehic J et al. (2015) Cut-off shoots method for estimation of partial resistance in apple cultivars to fruit tree canker caused by *Neonectria ditissima*. *Acta Agric Scand B Soil Plant Sci* 1-10.
- Gusberti M, Gessler C, Broggin GA (2013) RNA-Seq analysis reveals candidate genes for ontogenic resistance in *Malus-Venturia* pathosystem. *PloS one* 8, e78457.
- Jafari Ahmadabadi SAA, Askari-Hemmat H, Mohammadabadi M, et al. (2023) The effect of Cannabis seed on *DLK1* gene expression in heart tissue of Kermani lambs. *Agric Biotechnol J* 15 (1), 217-234 (In Persian).
- Katile SO, Perumal R, Rooney WL et al. (2010) Expression of pathogenesis-related protein PR-10 in sorghum floral tissues in response to inoculation with *Fusarium thapsinum* and *Curvularia lunata*. *Mol Plant Pathol* 11, 93-103.

- Kemmerling B, Schwedt A, Rodriguez P et al. (2007) Mü ssig C, Thomma BPHJ, Albrecht C, de Vries S, Hirt H, Nü rnberger T: The BRI1- associated kinase1, BAK1, has a brassinolideindependent role in plant cell-death control. *Curr Biol* 17, 1116-1122.
- Kędzierski Ł, Montgomery J, Curtis J. Handman E (2004) Leucine-rich repeats in host-pathogen interactions. *AITE* 52, 104-112.
- Kim KS, Beresford RM (2012) Use of a climatic rule and fuzzy sets to model geographic distribution of climatic risk for European eanker (*Neonectria galligena*) of apple. *Phytopathology* 102, 147-57.
- Komjanc M, Festi S, Rizzotti L et al. (1999) A leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRPKm1) gene is induced in *Malus× domestica* by *Venturia inaequalis* infection and salicylic acid treatment. *Plant Mol Biol* 40, 945-57.
- Linhard Pedersen H, Vittrup Christensen J, Hansen P (1994) Susceptibility of 15 apple cultivars to apple scab, powdery mildew, canker and mites. *Fruit Var J* 48, 97-100.
- Love M, Anders S, Huber W (2013) Differential analysis of count data—the DESeq2 package. In., 1-48.
- Masoudzadeh, S.H., Mohammadabadi, M.R., Khezri, A., et al. (2020) Dlk1 gene expression in different Tissues of lamb. *Iran J Appl Anim Sci* 10, 669-677.
- McCracken AR, Berrie A, Barbara DJ et al. (2003) Relative significance of nursery infections and orchard inoculum in the development and spread of apple canker (*Nectria galligena*) in young orchards. *Plant Pathol* 52, 553-66.
- McLeod LC, Poole PR (1994) Changes in enzymic activities after harvest and in early stages of *Botrytis cinerea* infection of kiwifruit. *J. Sci. Food Agric. J SCI FOOD AGR* 64(1), 95-100.
- Mohamadipoor L, Mohammadabadi M, Amiri Z, et al. (2021) Signature selection analysis reveals candidate genes associated with production traits in Iranian sheep breeds. *BMC Vet Res* 17 (1), 1-9.
- Mohammadabadi M, Masoudzadeh SH, Khezri A, et al. (2021) Fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder increases Delta-Like Non-Canonical Notch Ligand 1 gene expression in testis, liver, and humeral muscle tissues of growing lambs. *Heliyon* 7 (12), e08542.
- Mohammadinejad F, Mohammadabadi M, Roudbari Z, Sadkowski T (2022) Identification of Key Genes and Biological Pathways Associated with Skeletal Muscle Maturation and Hypertrophy in *Bos taurus*, *Ovis aries*, and *Sus scrofa*. *Animals* 12 (24), 3471.

- Mohammadabadi M, Golkar A, Askari Hesni M (2023) The effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) on insulin-like growth factor 1 gene expression in the rumen tissue of Kermani sheep. *Agric Biotechnol J* 15 (4), 239-256 (In Persian).
- Morant M, Bak S, Møller BL, Werck-Reichhart D (2003) Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. *Curr Opin Biotechnol* 14, 151-62.
- Nekrasov V, Wang C, Win J et al. (2017) Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Sci Rep* 7(1), 482.
- Nybohm H, Cervin-Hoberg C, Andersson M (2013) Oral challenges with four apple cultivars result in significant differences in oral allergy symptoms. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 161, 258-64.
- Petkovsek MM, Slatnar A, Stampar F, Veberic R (2011) Phenolic compounds in apple leaves after infection with apple scab. *Biol Plant* 55, 725-30.
- Pourcel L, Routaboul J-M, Kerhoas L et al. (2005) TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell* 17, 2966-80.
- Puehringer HM, Zinoecker I, Marzban G et al. (2003) MdAP, a novel protein in apple, is associated with the major allergen *Mal d 1*. *Gene* 321, 173-83.
- Robert N, Ferran J, Breda C et al. (2001) Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv. pisi: Expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. *Eur J Plant Pathol* 107, 249-61.
- Safaei SMH, Dadpasand M, Mohammadabadi M, et al. (2022) An *Origanum majorana* Leaf Diet Influences Myogenin Gene Expression, Performance, and Carcass Characteristics in Lambs. *Animals* 13 (1), e14.
- Sasnauskas A, Gelvonauskiene D, Gelvonauskis B et al. (2006) Resistance to fungal diseases of apple cultivars and hybrids in Lithuania. *Agron Res* 4, 349-52.
- Singh V, Singh A, Chand R. Singh B (2012) Genome wide analysis of disease resistance mlo gene family in sorghum. *Journal Plant Genom* 2, 18-27.
- Schenk MF, Cordewener JH, America AH et al. (2009) Characterization of PR-10 genes from eight *Betula* species and detection of Bet v 1 isoforms in birch pollen. *BMC plant biol* 9, 1-15.
- Schovankova J, Opatova H (2011) Changes in phenols composition and activity of phenylalanine-ammonia lyase in apples after fungal infections. *Hort-Science* 38, 1-10.

- Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2022) Effect of Fennel (*Foeniculum Vulgare*) Seed Powder Consumption on Insulin-like Growth Factor 1 Gene Expression in the Liver Tissue of Growing Lambs. *Gene Express* 21 (2), 21-26.
- Shokri S, Khezri A, Mohammadabadi M, Kheyroodin H (2023). The expression of MYH7 gene in femur, humeral muscle and back muscle tissues of fattening lambs of the Kermani breed. *Agric Biotechnol J* 15 (2), 217-236 (In Persian).
- Simons TJ, Ross A (1970) Enhanced peroxidase activity associated with induction of resistance to Tobacco mosaic virus in hypersensitive Tobacco. *Phytopathology* 60, 383-4.
- Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL (2009) TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinform* 25, 1105-11.
- Trognitz F, Manosalva P, Gysin R et al. (2002) Plant defense genes associated with quantitative resistance to potato late blight in *Solanum phureja* × dihaploid *S. tuberosum* hybrids. *MPMI* 15(6), 587-597.
- Torii KU (2004) Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *Int rev cyt* 234, 1-46.
- Veitch NC (2004) Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 65, 249-59.
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J et al. (2010) The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nat Genet* 42, 833-9.
- Venisse J-S, Malnoy M, Faize M et al. (2002) Modulation of defense responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. *MPMI* 15, 1204-12.
- Wan J, Zhang XC, Neece D et al. (2008) A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20(2), 471-81.
- Wang X, Gao Y, Yan Q, Chen W (2016) Salicylic acid promotes autophagy via NPR3 and NPR4 in *Arabidopsis* senescence and innate immune response. *Acta Physiol. Plant* 38, 1-12.
- Wang J, Tian W, Tao F et al. (2020) TaRPM1 positively regulates wheat high-temperature seedling-plant resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. tritici. *Front Plant Sci* 10, 1679.
- Zagaja SW, Millikan DF, Kaminski W, Myszk T (1971) Field resistance to *Nectria* canker in apple. *Plant Dis Rep* 55, 445-7.
- Zhu L, Ni W, Liu S et al. (2017) Transcriptomics analysis of apple leaves in response to *Alternaria alternata* apple pathotype infection. *Front. Plant Sci* 8, 22.

