

Evaluation of defense-related gene expression in the susceptible apple cultivar 'prima' against European canker using a transcriptomics approach

Marjan Ghasemkhani 

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

Abstract

Objective

European canker is one of the most destructive diseases affecting apple trees in temperate growing regions and is caused by the fungal pathogen *Neonectria ditissima*. Due to the pathogen's ability to persist year-round, effective disease control remains challenging. This study aimed to identify key genes and signaling pathways associated with susceptibility to *N. ditissima*. Elucidating the expression patterns and functional roles of these genes provides insight into the molecular mechanisms underlying disease development and may contribute to the development of more targeted and sustainable disease management strategies.

Materials and methods

The susceptible apple cultivar 'Prima' was inoculated by applying a fungal spore suspension to selected buds. Both inoculated and control samples ($n = 18$) were collected at 5, 15, and 30 days post-inoculation, with three biological replicates per time point, and used for total RNA extraction. RNA quality and quantity were evaluated prior to whole-transcriptome sequencing. Sequencing was performed in paired-end mode on the Illumina HiSeq 2000 platform. Raw read quality was assessed using FastQC, and high-quality reads were aligned to the apple reference genome using TopHat2. Differentially expressed genes (DEGs) were identified after normalization with DESeq2, and functional pathway enrichment analysis was conducted using the KEGG database.

Results

RNA-Seq analysis showed that the majority of transcriptional changes in the susceptible cultivar 'Prima' occurred at 15 and 30 days following inoculation with *N. ditissima*. A total of 6,996 differentially expressed genes (DEGs; $FDR < 0.05$) were identified, with more than 55% being up-regulated and approximately 45% down-regulated during the intermediate and late stages of infection. In contrast, no significant changes in gene expression were detected at 5 days post-inoculation. Notably, genes associated with cell wall biosynthesis and reinforcement, including *CAD* and *LAC1*, were down-regulated, while *MLO6*, a gene previously linked to enhanced disease susceptibility, showed strong up-regulation. Collectively, these expression patterns point to a

disrupted coordination between structural and chemical defence responses in the susceptible cultivar, indicating an overall ineffective defence strategy against the pathogen.

Conclusions

The results suggest that in the susceptible apple cultivar, defence responses are mainly triggered at later stages of *N. ditissima* infection and are not sufficiently activated during the early phase of pathogen establishment. The gene expression patterns observed indicate a disruption in key defence-related pathways, along with altered regulation of genes associated with susceptibility. Taken together, genes that exhibited consistent and significant expression changes in this study represent potential candidates for molecular markers in apple breeding programmes, although their utility will require validation in independent populations and further functional characterization.

Keywords: gene expression, apple (*Malus × domestica*), RNA-Seq analysis, host–pathogen interaction, susceptibility genes

Paper Type: Research Paper.

Citation: Ghasemkhani, M. (2026). Evaluation of defense-related gene expression in the susceptible apple cultivar 'prima' against European canker using a transcriptomics approach. *Agricultural Biotechnology Journal*, 18(2), 21-40.

Agricultural Biotechnology Journal, 18(2), 21-40.

DOI: 10.22103/jab.2026.25863.1765

Received: December 09, 2025.

Received in revised form: January 25, 2026.

Accepted: January 26, 2026.

Published online: February 28, 2026.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.



© the authors

Introduction

European canker is a serious disease in apple orchards, especially in cool, wet climates. It's caused by the fungus *Neonectria ditissima*, which gets into the tree through wounds on branches or the trunk and then spreads through the vascular tissues. This leads to dying branches, lower yields, and shorter orchard life. The fungus attacks a wide range of broadleaf trees, making it hard to control. Traditional management involves pruning infected parts and protecting wounds, but fungicides only work for a short time and aren't very effective. Because of this, breeders focus on developing resistant or tolerant varieties as a more sustainable solution. Past research, using both artificial inoculations and natural infections, has shown clear genetic differences in how apple cultivars respond to the pathogen, and some relatively resistant ones have been identified. Still, we don't fully understand the molecular details behind resistance or susceptibility, which is why we need modern genomic tools. Transcriptomic work has revealed that *N. ditissima* releases a variety of effectors, cell-wall-degrading enzymes (CAZymes), and toxic secondary metabolites during infection. This suggests the fungus uses sophisticated strategies to colonize the host. In turn, plant resistance is probably polygenic and changes over time. QTL studies in apple support

this, identifying several loci linked to canker resistance, but each explains only a small part of the variation (3–19%). This points to resistance being the combined effect of many genes rather than a single major gene. Quantitative resistance like this tends to be more durable against evolving pathogens compared to single-gene resistance. Tools like RNA-Seq are ideal for exploring these complex interactions at the whole-genome level. With the apple genome now fully sequenced, RNA-Seq can pinpoint genes and pathways involved in susceptibility or resistance, laying the groundwork for marker-assisted breeding and precise genetic improvements. In this study, we used RNA-Seq to examine transcriptomic changes in the highly susceptible cultivar 'Prima' during *N. ditissima* infection. Our goal was to identify genes and pathways associated with susceptibility across different infection stages and suggest candidates for further functional studies and breeding.

Materials and methods

We used a completely randomized factorial design in a greenhouse. Eighteen one-year-old 'Prima' apple trees on M9 rootstock, selected for uniform branch size, came from a commercial nursery in Lund, southern Sweden (55°42' N, 13°12' E; ~45 m elevation). There were two treatments, inoculated and mock-inoculated (control with distilled water), each with three biological replicates (one tree per replicate). Spore suspension of *N. ditissima* was prepared from sporodochia collected from naturally infected trees at Balsgård research orchard, southern Sweden. Spores were cultured on 1.5% agar at 21°C, macroconidia isolated and re-cultured to produce fresh sporodochia. Concentration was adjusted to 1×10^5 conidia/mL using a hemocytometer. Germination rate was confirmed at ~80% after 24 h at 21°C. Four terminal buds per tree (positions 11, 14, 17, 20) were wounded with a sterile scalpel and inoculated with 10 µL spore suspension; controls received water. Wounds were sealed with Vaseline. Trees were kept under ambient greenhouse conditions (18–25°C, natural light, weekly watering, no fungicides or fertilizers). Samples (three buds per tree) were taken at 5, 15, and 30 days post-inoculation, flash-frozen in liquid nitrogen, and stored at –80°C. Total RNA was extracted from pooled buds using the RNeasy Micro Kit (QIAGEN, cat. no. 74104). Quality was checked with NanoDrop (purity/concentration) and Experion system (integrity, RQI ≥ 9.8). One µg high-quality RNA per sample was sent to NGI (SciLifeLab, Sweden) for Illumina library preparation and paired-end sequencing (2 × 100 bp) on HiSeq 2000. Raw reads were quality-controlled with FastQC and trimmed using Trimmomatic. Clean reads were mapped to the apple genome v1.0 with TopHat2 (no novel junctions). Counts were generated with HTSeq-count and normalized/analyzed for differential expression using DESeq2 ($|\log_2FC| \geq 1$, FDR ≤ 0.05). GO and KEGG enrichment were performed with Blast2GO and AgriGO.

Results

Sequencing produced 218 million paired-end reads (average 10.9 million per sample). After trimming, ~85% remained high-quality, with >80% mapping to the apple genome. PCA on normalized counts showed PC1 (62% variance) separating inoculated from control samples, and PC2 (18% variance) reflecting time points. At 5 dpi, treatments overlapped

considerably; separation increased at 15 and 30 dpi. No DEGs were found at 5 dpi. At 15 dpi, 2,694 DEGs were identified (1,578 up, 1,116 down). At 30 dpi, 6,996 DEGs were detected (2,994 up, 4,002 down). GO enrichment highlighted early involvement of stimulus response and signaling terms (15 dpi) and stronger metabolic/catalytic activity enrichment later (30 dpi). Key genes correlated with susceptibility included strong upregulation of *MLO6* (\log_2FC +2.49 at 15 dpi, +2.84 at 30 dpi) and general downregulation of lignin biosynthesis genes (*CAD*, *LAC1*, *ATOMT1*), transporter *ATMRP5*, chitinase *CHIB1* (mixed pattern), and stress-response genes *GLT1* and *RD2*.

Conclusions

The transcriptomic response of 'Prima' to *N. ditissima* is delayed, with major changes appearing only in intermediate and late infection stages. Early transcriptomic silence does not necessarily mean no defense activation-responses may occur at post-transcriptional or metabolic levels. The pattern-upregulation of the negative defense regulator *MLO6* alongside downregulation of genes involved in cell wall strengthening, secondary metabolism, and stress response-correlates with the susceptible phenotype. This suggests coordinated dysregulation across multiple defense layers, but causality remains unproven without functional studies. These genes are promising candidates for future validation and could serve as molecular markers in breeding for canker resistance. The findings highlight the complex, polygenic nature of susceptibility in apple and the value of timed transcriptomic profiling. Integrating RNA-Seq with physiological, histological, and functional assays in both susceptible and resistant cultivars will be essential to uncover causal mechanisms and develop durable resistance strategies in perennial crops.

Data availability statement

The datasets generated and analyzed during the current study are available in this article.

Acknowledgements

I acknowledge the Science for Life Laboratory, NGI, and Uppmax for providing sequencing and computational resources. I also thank Dr. Larisa Garkava-Gustavsson and Dr. Hilde Nybom for insightful guidance and valuable advice on experimental design. I am also grateful to Björn Canbäck for assistance with bioinformatics.

Funding

This study was supported financially by the Swedish Royal Academy of Agriculture and Forestry (KSLA), the Swedish Research Council Formas, and the Institute of Science, High Technology, and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran (Grant No. 849/03/S/1).

Conflict of interest

No conflict of interest exists for any of the authors regarding this study.

ارزیابی بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ دفاعی در رقم حساس سیب "پریم" در مواجهه با

بیماری شانکر اروپایی با رویکرد توالی‌یابی رونوشت‌ها

مرجان قاسم خانی

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه تنوع زیستی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی

صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: M.ghasemkhani@kgut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۱۸ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۱۱/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۰۶

چکیده

هدف: بیماری شانکر اروپایی، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های درختان میوه در مناطق معتدل تولیدکننده سیب، توسط قارچ *Neonectria ditissima* ایجاد می‌شود. با توجه به بقای مستمر این پاتوژن در طول سال، کنترل بیماری با چالش‌های قابل توجهی همراه است. این پژوهش با هدف شناسایی ژن‌های کلیدی و مسیرهای سیگنالینگ دخیل در حساسیت به این عامل بیماری‌زا انجام شد. شناسایی این ژن‌ها و تحلیل عملکرد آن‌ها می‌تواند مسیرهای مولکولی دخیل در پیشرفت بیماری را روشن ساخته و به طراحی برنامه‌های کنترل هدفمند و پایدار منجر شود.

مواد و روش‌ها: برای این مطالعه، یک رقم حساس سیب به نام "پریم" با سوسپانسیون قارچ بر روی جوانه‌های انتخاب شده تلقیح شد. نمونه‌های کنترل و تلقیح‌شده (۱۸ نمونه) در زمان‌های ۵، ۱۵ و ۳۰ روز پس از تلقیح با سه تکرار بیولوژیکی در هر زمان جمع‌آوری گردیدند تا RNA کل استخراج شود. پس از انجام کنترل کیفی و کمی RNA های استخراج‌شده، توالی‌یابی کل ژنوم به صورت paired-end و دستگاه Hiseq2000 انجام شد. کیفیت داده‌های توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار FastQC بررسی شد. سپس خوانش‌ها با نرم‌افزار TopHat2 روی ژنوم مرجع سیب نقشه‌یابی شدند. نرمال‌سازی و تحلیل ژن‌های با بیان افتراقی با نرم‌افزار DESeq2 صورت گرفت و آنالیز غنی‌سازی مسیرهای مرتبط با DEGs از طریق نرم‌افزار KEGG انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد که بیشترین تغییرات بیان ژن در روزهای ۱۵ و ۳۰ پس از آلودگی با *N. ditissima* رخ داد و در مجموع ۶۹۹۶ ژن با بیان افتراقی ($FDR < 0.05$) شناسایی شد؛ به طوری که بیش از ۵۵ درصد افزایش بیان و حدود ۴۵ درصد کاهش بیان در مراحل میانی و پیشرفته عفونت مشاهده گردید، در حالی که در روز ۵ هیچ ژن معناداری شناسایی نشد. کاهش بیان ژن‌های مرتبط با استحکام دیواره سلولی (*CAD, LACI*) و افزایش بیان ژن حساسیت‌زا (*MLO6*) که نقش کلیدی داشتند، نشان‌دهنده ناهماهنگی مسیرهای دفاعی ساختاری و شیمیایی و پاسخ دفاعی ناکارآمد رقم حساس در برابر پاتوژن است.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که در رقم حساس سیب، پاسخ‌های دفاعی در برابر *N. ditissima* عمدتاً در مراحل دیرتر آلودگی فعال می‌شوند و در مراحل اولیه ضعیف هستند. الگوی بیان ژن‌ها بیانگر تضعیف برخی مسیرهای دفاعی و تغییر بیان ژن‌های مرتبط با حساسیت گیاه است. بر این اساس، ژن‌هایی که تغییر بیان معنادار و پایدار نشان دادند می‌توانند به‌عنوان کاندیداهای بالقوه نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های اصلاحی آینده مطرح شوند، مشروط بر آن که در جمعیت‌های مستقل و از طریق مطالعات عملکردی اعتبارسنجی شوند.

کلیدواژه‌ها: بیان ژن، تحلیل RNA-Seq، تعامل میزبان - پاتوژن، ژن‌های مرتبط با حساسیت، سیب (*Malus × domestica*)
نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: قاسم خانی مرجان (۱۴۰۵) ارزیابی بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ دفاعی در رقم حساس سیب "پریم" در مواجهه با بیماری شانکر اروپایی با رویکرد توالی‌یابی رونوشت‌ها. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۸(۲)، ۲۱-۴۰.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian

Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

بیماری شانکر اروپایی که عامل آن قارچ *Neonectria ditissima* است، یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌ها در باغ‌های سیب (*Malus × domestica*) به‌ویژه در مناطق معتدل و پرباران به شمار می‌رود (Weber et al., 2014). این پاتوژن چوبی از طریق زخم‌های ایجادشده در شاخه یا تنه وارد بافت میزبان شده و سپس از راه آوندها گسترش می‌یابد (Ghasemkhani, 2015a). خسارت‌های ناشی از این بیماری شامل خشکیدگی شاخه‌ها، کاهش عملکرد و کوتاه‌شدن عمر اقتصادی باغ است و در مناطق آلوده، تهدیدی جدی برای پایداری تولید محسوب می‌شود. دامنه میزبانی گسترده این قارچ که بسیاری از گونه‌های پهن‌برگ را در بر می‌گیرد (Weber et al., 2014) مدیریت آن را دشوارتر کرده است. کنترل این بیماری معمولاً با روش‌های مدیریتی مانند حذف بافت آلوده، هرس و ضدعفونی انجام می‌شود، اما اثر قارچ‌کش‌ها محدود و کوتاه‌مدت است. از این رو، استفاده از ارقام مقاوم یا نیمه‌مقاوم به‌عنوان راهکاری پایدار توصیه می‌شود (Karlström et al., 2022). مطالعات مبتنی بر تلقیح مصنوعی و بررسی آلودگی طبیعی، تفاوت ژنتیکی قابل توجهی را در پاسخ دفاعی ارقام سیب نشان داده و ارقام دارای مقاومت نسبی شناسایی شده است (Wenneker et al., 2017). با این حال، مکانیسم‌های مولکولی و مسیرهای ژنتیکی مؤثر در این مقاومت هنوز به‌طور کامل شناخته نشده و همین امر ضرورت پژوهش‌های ژنومی پیشرفته را برجسته می‌کند. پژوهش‌های ترنسکریپتومی نشان داده‌اند که *N. ditissima* در طی عفونت، مجموعه‌ای از پروتئین‌ها و آنزیم‌های فعال، از جمله CAZyme ها و متابولیت‌های ثانویه سمی را ترشح می‌کند (Gómez-Cortecero et al., 2019). این یافته‌ها بیانگر آن است که قارچ از مسیرهای مولکولی پیچیده و چندگانه

برای نفوذ و پیشروی در بافت میزبان استفاده می‌کند. بنابراین، مقاومت گیاه نیز ماهیتی پیچیده و چندژنی دارد. مطالعات QTL در سبب این فرضیه را تأیید کرده‌اند و چندین QTL مرتبط با مقاومت به شانکر اروپایی شناسایی شده که هر یک تنها بخشی از تنوع فنوتیپی (۱۹-۴/۳ درصد) را توضیح می‌دهند (Bus et al., 2019; Karlström et al., 2022). این نتایج نشان می‌دهد که مقاومت نسبی سبب حاصل اثر تجمعی چندین ژن و مسیر دفاعی است و هیچ ژن منفردی پاسخ کامل را فراهم نمی‌کند (Karlström et al., 2024). در مقیاس کلان‌تر، مقاومت کمی برخلاف مقاومت کیفی مبتنی بر ژن‌های منفرد، پایداری بیشتری در برابر تغییرات ژنتیکی پاتوژن را دارد. این نوع مقاومت حاصل هم‌افزایی چندین ژن در مسیرهایی مانند سیگنالینگ هورمونی، سنتز متابولیت‌های ثانویه و بازآرایی دیواره سلولی است. شناسایی ژن‌های حساس در این شبکه‌ها می‌تواند به حذف یا خاموش‌سازی آن‌ها و ایجاد مقاومت پایدار کمک کند؛ رویکردی که برای بیماری پیچیده‌ای مانند شانکر اروپایی بسیار کارآمد است (Ghasemkhani, 2024). مطالعات روی سبب وحشی (*Malus sieversii*) نشان داده‌اند که طی عفونت، ژن‌های مرتبط با متابولیت‌های ثانویه، مسیرهای هورمونی و دفاع دیواره سلولی تغییر بیان قابل‌توجهی دارند (Liu et al., 2021). این نتایج تأیید می‌کند که مقاومت یا حساسیت گیاه حاصل شبکه‌ای پویا و چندلایه است که در مراحل مختلف عفونت فعال می‌شود (Kaur et al., 2022). فناوری‌های ژنومی پیشرفته مانند RNA-Seq ابزار قدرتمندی برای درک دقیق مکانیسم‌های مولکولی حساسیت گیاهان به پاتوژن‌ها فراهم می‌کنند. این روش با امکان توالی‌یابی و کمی‌سازی رونوشت‌های RNA، تغییرات بیان ژن‌ها را در سطح کل ژنوم و تحت شرایط مختلف تنش بررسی می‌کند. با توجه به دسترسی به توالی کامل ژنوم سبب، RNA-Seq می‌تواند ژن‌های مرتبط با حساسیت و کاهش مقاومت را شناسایی و مسیرهای سیگنالینگ دفاعی و تعاملات ژنی را آشکار سازد. در مطالعات پیشین درختان میوه مانند سبب، RNA-Seq به‌طور گسترده برای شناسایی ژن‌ها و مسیرهای درگیر در پاسخ به پاتوژن‌های قارچی مهمی نظیر *Venturia inaequalis* عامل لکه سیاه سبب، *Podosphaera leucotricha* عامل سفیدک پودری به کار رفته است (Pessina et al., 2016). مطالعات ترنسکریپتومی در گلابی (*Pyrus spp.*) نیز تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با دفاع گیاه در پاسخ به آلودگی با *Botryosphaeria dothidea* (عامل پوسیدگی حلقوی) را آشکار کرده‌اند (Yu et al., 2024). در مرکبات (*Citrus spp.*) این فناوری برای بررسی پاسخ‌های مولکولی مرتبط با مقاومت یا حساسیت به پاتوژن‌های قارچی نظیر *Phytophthora spp.* مورد استفاده قرار گرفته است (Ajengui et al., 2017). همچنین در انگور (*Vitis vinifera*)، این رویکرد برای مطالعه پاسخ‌های دفاعی به پاتوژن‌هایی مانند *Plasmopara viticola* (عامل سفیدک دروغی) به کار رفته است (Gong et al., 2022). در مجموع، این مطالعات نشان می‌دهند که RNA-Seq می‌تواند مبنایی قابل اتکا برای شناسایی ژن‌ها و مسیرهای کلیدی مرتبط با پاسخ به بیماری در درختان میوه فراهم سازد و زمینه را برای مطالعات عملکردی آتی و توسعه راهبردهای اصلاحی ژنتیکی هدفمندتر ایجاد کند. در این مطالعه تمرکز بر شناسایی ژن‌های حساس در رقم آسیب‌پذیر سبب است؛ ژن‌هایی که نقش کلیدی در کاهش مقاومت گیاه در برابر *N. ditissima* دارند. تحلیل ترنسکریپتوم با استفاده از RNA-Seq، امکان شناسایی این ژن‌ها را در مراحل مختلف عفونت فراهم می‌کند و می‌تواند الگوهای بیان غیرعادی یا سرکوب‌شده مرتبط با حساسیت را آشکار سازد. شناسایی این

ژن‌ها نه تنها به درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی حساسیت کمک می‌کند، بلکه بستر لازم برای استفاده از روش‌های نوین اصلاح ژنتیکی مانند خاموش‌سازی ژن، ویرایش ژنومی (CRISPR/Cas9) یا انتخاب مارکر محور را فراهم می‌آورد. این رویکرد که بر مهندسی شبکه‌های ژنتیکی و مسیرهای دفاعی متمرکز است، می‌تواند به توسعه ارقام سیب با مقاومت چندلایه و پایدار در برابر شانکر اروپایی منجر شود.

مواد و روش‌ها

نمونه های بیولوژیکی: در این مطالعه، از درختان یک‌ساله سیب (*Malus × domestica*) با قطر شاخه های تقریباً یکسان رقم حساس "پریم" استفاده شد. درختان سیب زده روی پایه M9 به صورت نهال‌های یکنواخت از یک نهالستان تجاری واقع در شهر لوند در جنوب سوئد (ارتفاع از سطح دریا ~45 m; 55°42' N, 13°12' E) تهیه شدند. طرح آزمایش شامل دو تیمار (شاهد و تلقیح‌شده) بود که هر تیمار در سه تکرار مستقل (هر تکرار شامل یک درخت) اجرا شد و در مجموع ۱۸ درخت مورد استفاده قرار گرفت. تمام مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش از همان نهالستان تجاری تأمین شده و پس از انتقال، در یک گلخانه با شرایط محیطی طبیعی نگهداری شدند. رقم "پریم" بر اساس گزارش‌های پیشین که حساسیت آن به بیماری شانکر اروپایی را نشان داده‌اند، به عنوان رقم حساس در این مطالعه انتخاب شد (Ghasemkhani et al., 2024). این مقاومت به واسطه ژن *Vf* از گونه *Malus floribunda* حاصل شده که نقش مهمی در پایداری مقاومت ایفا می‌کند (Bradshaw 2017). در طول مدت آزمایش (تقریباً دو ماه: سپتامبر تا اکتبر)، درختان در گلدان و در یک گلخانه بدون کنترل دما نگهداری شده و هفته‌ای یک بار آبیاری شدند. شرایط محیطی گلخانه شامل دمای ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در حدود ۵ تا ۶ ساعت تابش ملایم خورشید در روز و رطوبت نسبی متغیر (عموماً بالاتر از ۶۰ درصد) بود. در این دوره از هیچ قارچ‌کش یا کود شیمیایی استفاده نشد تا شرایط یکنواخت رشد فراهم گردد و تأثیر عوامل محیطی بر پاسخ گیاهان به حداقل برسد.

تهیه و تعیین غلظت سوسپانسیون اسپورهای *Neonectria ditissima*: برای تهیه سوسپانسیون قارچ *N.*

ditissima از ساختارهای اسپورزا به نام اسپورودوخیوم استفاده شد. این اندام‌ها که حاوی اسپورهای غیرجنسی شامل ماکروکنیدی‌ها و میکروکنیدی‌ها هستند، از درختان سیب آلوده شده به صورت طبیعی در باغ تحقیقاتی بالسگارد واقع در جنوب سوئد جمع‌آوری گردیدند. اسپورهای جمع‌آوری شده ابتدا در محیط کشت آگار (Difco آمریکا) ۱/۵ درصد در دمای ۲۱°C کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت، ماکروکنیدی‌های منفرد شناسایی شده با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل Leica DMLB با ویژگی‌های مورفولوژیک مشخص هلال شکل و چندسلولی بر روی محیط کشت آگار ۱/۵ درصد مجدداً کشت داده شدند تا اسپورودوخیوم تولید شود. محیط‌های کشت آماده شده تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای تعیین غلظت اسپورها، شمارش

ماکروکنیدی‌ها با استفاده از هموسیتومتر و میکروسکوپ نوری مدل Leica DMLB انجام شد. براساس شمارش مستقیم، سوسپانسیون نهایی با غلظت 1×10^5 کنیدی در هر میلی‌لیتر تهیه گردید.

فرآیند تلقیح و نمونه برداری: پیش از آغاز فرآیند تلقیح، جوانه‌زنی موفق اسپورهای قارچ *N. ditissima* براساس

مطالعات پیشین (Ghasemkhani et al., 2015b; Ghasemkhani, 2024) تأیید گردید تا از زنده‌مانی و قابلیت بیماری‌زایی آن‌ها اطمینان حاصل شود، به طوریکه ۲۴ ساعت در دمای 21°C انکوبه شدند و تقریباً ۸۰ درصد جوانه زنی ثبت گردید. برای هر درخت، چهار جوانه انتهایی با شماره‌های ۱۱، ۱۴، ۱۷ و ۲۰ از رأس شاخه‌ها با استفاده از اسکالپل استریل برش داده شدند. سپس محل برش هر جوانه با ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ (با غلظت 1×10^5 کنیدی در میلی‌لیتر آب مقطر) تلقیح گردید. حجم تلقیح استفاده شده در این پژوهش بر اساس ماهیت بافت جوانه‌های یک‌ساله انتخاب شد، اما در بافت‌های چوبی‌تر درختان چندساله، به دلیل تراکم بالاتر سلولی و محدودیت نفوذ، حجم‌های بالاتر برای شبیه‌سازی بهتر عفونت طبیعی توصیه می‌شود (Agrios, 2005; Weber, 2014). درختان شاهد، به همان تعداد درختان تلقیح شده، با آب مقطر تیمار شدند تا بتوان اثر تلقیح پاتوژن را با شرایط بدون پاتوژن مقایسه کرد. پس از نفوذ کامل سوسپانسیون در بافت گیاهی (۱۰ دقیقه)، ناحیه زخم با لایه‌ای نازک از وازلین پوشانده شد تا از خشک شدن و آلودگی ثانویه جلوگیری شود. درختان تلقیح شده در گلخانه‌ای با دمای محیط نگهداری شدند. نمونه‌برداری از چوب و پوست اطراف نواحی تلقیح شده در سه زمان مختلف (۵، ۱۵ و ۳۰ روز پس از تلقیح) انجام شد. انتخاب زمان‌های ۵، ۱۵ و ۳۰ روز پس از تلقیح بر اساس دینامیک شناخته شده برهم کنش میزبان-پاتوژن بود. روز پنجم مرحله اولیه عفونت و فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی ذاتی، روز پانزدهم مرحله میانی و تثبیت کلونیزاسیون پاتوژن، و روز سی‌ام مرحله پیشرفته و تثبیت علائم شانگری را نشان می‌دهد (Weber, 2014). برای هر زمان، سه جوانه از هر درخت مورد بررسی قرار گرفت. پیش از نمونه‌برداری، وازلین با استفاده از دستمال کاغذی استریل حذف شد. نمونه‌های برداشت شده بلافاصله در نیتروژن مایع غوطه‌ور شده و تا زمان استخراج RNA در دمای -80°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در این مطالعه، هر درخت به‌عنوان یک تکرار بیولوژیکی در نظر گرفته شد. برای هر نقطه زمانی (۵، ۱۵ و ۳۰ روز)، سه تکرار بیولوژیکی (۳ درخت) و دو نوع تلقیح (قارچ *N. ditissima* و آب مقطر) لحاظ گردید. در مجموع، ۱۸ درخت سیب ($3 \times 3 \times 2$) برای استخراج RNA و تحلیل‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. این پژوهش از نظر طراحی آزمایش مبتنی بر یک طرح کاملاً تصادفی (CRD) با ساختار فاکتوریل بوده است که در آن عوامل اصلی شامل رقم (حساس) و زمان پس از آلودگی بوده‌اند. نمونه‌ها در زمان‌های مختلف پس از تلقیح با *N. ditissima* برداشت شده و پاسخ‌ها در سطح ترنسکرپتومی مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

آماده‌سازی مولکولی نمونه‌ها جهت توالی‌یابی RNA با فناوری Illumina: برای استخراج RNA، سه جوانه

نمونه‌برداری شده از هر درخت با یکدیگر ترکیب شدند تا نماینده‌ای جامع از ناحیه تلقیح شده به‌دست آید. RNA کل از این نمونه‌های ترکیبی با استفاده از کیت تجاری RNeasy Micro (QIAGEN)، شماره کاتالوگ ۷۴۱۰۴ مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده

استخراج گردید. جهت ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده، خلوص و غلظت آن با استفاده از دستگاه نانودراپ (NanoDrop، Wilmington، ایالات متحده) اندازه‌گیری شد. همچنین، یکپارچگی و سلامت RNA با بهره‌گیری از دستگاه الکتروفورز تمام اتوماتیک (Experion Bio-Rad Laboratories، Hercules، ایالات متحده) بررسی گردید. این دستگاه مبتنی بر فناوری میکروسیال LabChip بوده و فرایندهای جداسازی، تشخیص و تحلیل داده‌های حاصل از الکتروفورز اسیدهای نوکلئیک را در یک پلتفرم یکپارچه انجام می‌دهد، که موجب افزایش دقت و کاهش خطای انسانی در ارزیابی کیفیت نمونه‌ها می‌گردد (Denisov et al., 2008). نمونه‌های RNA کل با غلظت ۲۵۰ نانوگرم در میکرولیتر پس از تأیید کیفیت، به موسسه ملی ژنومیک سوئد (NGI Genomics Infrastructure, SciLifeLab – National) ارسال شدند. در این مرکز، یک میکروگرم از RNA کل هر نمونه برای تهیه کتابخانه‌های توالی‌یابی مورد استفاده قرار گرفت. کتابخانه‌های cDNA با استفاده از کیت استاندارد Illumina ساخته شدند و مراحل شامل قطعه‌بندی RNA، سنتز cDNA، اضافه کردن آداپتورهای توالی‌یابی و پاکسازی کتابخانه‌ها بود. کتابخانه‌های آماده‌شده به صورت چندگانه (Multiplexed) ترکیب شدند تا چند نمونه به طور همزمان در یک لاین توالی‌یابی شوند. این ترکیب‌ها در دو لاین دستگاه Illumina HiSeq در حالت High Output و با روش توالی‌یابی جفت‌پایان (Paired-End) با طول خوانش ۱۰۰×۲ جفت‌باز اجرا شد. توالی‌یابی مطابق دستورالعمل سازنده Illumina و با کنترل‌های کیفیت داخلی انجام شد تا دقت و پوشش کافی برای تجزیه و تحلیل بیان ژن‌ها حاصل شود.

پردازش داده‌های ترانسکریپتوم و بررسی مسیرهای زیستی فعال: کنترل کیفیت خوانش‌های RNA-Seq

مربوط به نمونه‌های سیب با استفاده از نرم‌افزار FastQC نسخه ۰.۱۱.۲ انجام شد. با وجود کیفیت کلی مطلوب، نتایج نشان داد که برخی خوانش‌ها همچنان حاوی توالی آداپتور مربوط به پلتفرم Illumina هستند. این توالی‌ها، به همراه خوانش‌هایی با میانگین کیفیت کمتر از ۲۸ (بر اساس امتیاز Phred)، با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic نسخه ۰.۳۲ حذف شدند. برای نگاشت خوانش‌ها، از نرم‌افزار TopHat2 نسخه ۲.۰.۱۳ استفاده شد که قابلیت نگاشت خوانش‌های دارای اتصال (spliced reads) را داراست. در مرحله نخست، خوانش‌ها به ژنوم مرجع سیب نسخه مونتاژ ۱ و ژنوم مرجع قارچ *Nectria haematococca* که از خانواده‌ای مشابه با *N. ditissima* است نگاشت شدند. هدف از این نگاشت دوگانه، جدا کردن خوانش‌های گیاهی از خوانش‌های قارچی و تعیین دقیق تغییرات بیان ژن در گیاه میزبان بود. با توجه به نبود ژنوم کامل و معتبر برای *N. ditissima*، استفاده از ژنوم نزدیک‌ترین گونه شناخته‌شده به عنوان مرجع، امکان تحلیل تعاملات میزبان-پاتوژن را فراهم کرد و اجازه داد تا ژن‌های بیان‌شده در سیب و ژن‌های احتمالی قارچی که در نمونه‌ها حضور دارند، تفکیک شوند. در TopHat2، شناسایی اتصال‌های جدید غیرفعال شد تا فقط خوانش‌های منطبق با ویژگی‌های اگزونی فایل gff¹ گزارش شوند. با استفاده از این فایل، TopHat2 تنها خوانش‌هایی را در نظر گرفت که دقیقاً با مرزهای اگزون‌های شناخته‌شده و مستند در ژنوم سیب مطابقت داشتند و از پیش‌بینی اگزون یا اتصال

¹ - General Feature Format

جدید خودداری کرد. این روش به کاهش خطاهای احتمالی و تمرکز بر ژن‌های شناخته شده کمک می‌کند. شمارش خوانش‌ها برای هر ژن با استفاده از نرم‌افزار HTseq-count نسخه ۰.۶.۱ و گزینه intersection-nonempty انجام گرفت. نرمال‌سازی داده‌ها و تحلیل بیان افتراقی ژن‌ها با بسته نرم‌افزاری DESeq2 صورت گرفت. برای شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs²) بین نمونه‌ها، از دستور contrast در DESeq2 استفاده شد و آستانه نرخ کشف اشتباه (FDR) برابر با ۰/۰۵ و مقدار مطلق $\log_2(\text{Fold Change}) \geq 1$ (معادل تغییر بیان $2 \leq$ یا $0.5 \geq$) در نظر گرفته شد. این معیارها اطمینان می‌دهند که تنها ژن‌هایی با تغییر بیان معنادار و بیولوژیکی قابل توجه در تحلیل‌ها در نظر گرفته شوند و مقادیر Fold Change به صورت $\log_2\text{FC}$ محاسبه شده‌اند تا توزیع داده‌ها نرمال‌تر شود و مقایسه بین نمونه‌ها آسان‌تر گردد. تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) با استفاده از نرم‌افزار R انجام شد تا الگوهای کلی بیان ژن‌ها بررسی گردد. در این تحلیل، هر ژن به‌عنوان یک متغیر و هر نمونه به‌عنوان یک مشاهده در نظر گرفته شد تا الگوهای کلی تغییر بیان ژن، شباهت‌ها و تفاوت‌های بین نمونه‌ها، ساختار خوشه‌ای داده‌ها و اثرات تیمار (تلقیح در مقابل شاهد) در سطح ترانسکریپتوم بررسی شود. سپس اصطلاحات مربوط به رده‌بندی عملکردی ژن‌ها (GO) از پایگاه داده www.rosaceae.org استخراج و در نرم‌افزار Blast2Go نسخه ۲.۸ بارگذاری شدند. تحلیل مسیرهای زیستی با استفاده از قابلیت KEGG در ابزار تحت وب Blast2Go انجام گرفت. در ادامه، اصطلاحات GO مربوط به ژن‌های دارای بیان افتراقی (DEGs) با استفاده از قابلیت gene enrichment در ابزار تحت وب غنی‌سازی شدند تا مسیرهای زیستی مهم و معنادار شناسایی گردد.

نتایج

پردازش و اعتبارسنجی داده‌های RNA-Seq: در این پژوهش، بررسی کیفیت RNA نتایج شاخصی داشت؛ تمامی

نمونه‌ها دارای $RQI \geq 9.8$ و نسبت جذب $280/260$ بیش از $1/8$ بودند و الکتروفورز حضور دو باند مشخص و مجزا مربوط به RNAهای 18S و 28S را نشان داد که نبود اسمیر و تخریب قابل مشاهده در نمونه‌ها را تأیید می‌کند (شکل ۱). این ترکیب از طراحی دقیق آزمایش، داده‌های با کیفیت بالا و نرخ نگاشت چشمگیر، بستری مطمئن و قوی برای تحلیل‌های افتراقی بیان ژن فراهم کرد. توالی‌یابی RNA-Seq بر روی ۱۸ نمونه از بافت‌های رقم "پریما"، شامل نه نمونه تلقیح‌شده با قارچ *N. ditissima* و نه نمونه‌های تلقیح‌شده با آب مقطر به عنوان شاهد، انجام شد که در مجموع ۲۱۸ میلیون خوانش دوطرفه تولید کرد. خوانش‌های خام اولیه به ازای هر نمونه میانگین ۱۰۰۹۰ میلیون (میانگین: ۱۰۰۷۵ میلیون، حداقل: ۹۰۲۷ میلیون، حداکثر: ۱۲۰۵۲ میلیون، انحراف استاندارد: ۰/۹۶) بود. پس از تمیزکاری با Nesoni-0.118، میانگین خوانش‌ها به ۱۰۰۴۴ میلیون کاهش یافت و میانگین خوانش‌های نگاشت‌یافته به مرجع ژنوم سیب حدود ۸۰۵۷ میلیون (با نرخ نگاشت کلی ۸۳/۰۲ درصد) بود. توزیع خوانش‌ها در تمام مراحل (خام،

² - Differentially Expressed Genes

تمیز شده و نگاشت یافته) نسبتاً یکنواخت بود و هیچ ناهنجاری قابل توجهی که بر تحلیل‌های پایین‌دستی تأثیرگذار باشد، مشاهده نشد. میانگین همبستگی درون‌گروهی حدود ۰/۹۵ (دامنه ۰/۹۲-۰/۹۸) بود، که نشان‌دهنده تکرارپذیری بالای داده‌هاست. هیچ تکرار ناهنجاری شناسایی نشد. ارزیابی اولیه کیفیت داده‌ها با FastQC نشان داد که بیش از ۹۵ درصد بازها دارای نمره Q30 یا بالاتر بودند که بیانگر دقت بالای فراخوانی بازهاست. با پالایش داده‌ها به وسیله Trimmomatic و حذف بازهای کم‌کیفیت، آداپتورها و توالی‌های مزاحم، ۱۸۷ میلیون خوانش (۸۵ درصد داده‌های اولیه) حفظ شد. نگاشت این خوانش‌های پالایش‌شده به ژنوم مرجع سیب با استفاده از TopHat2، نرخ تطابق بیش از ۸۰ درصد معادل حدود ۱۶۹ میلیون خوانش را نشان داد که از نظر کیفیت و کامل بودن داده‌ها در سطحی بسیار مطلوب است. نتایج نشان داد حدود ۸۵-۷۵ درصد خوانش‌های نگاشت‌یافته به مناطق اگزونی، ۱۵-۱۰ درصد به مناطق اینترونی و کمتر از ۱۰ درصد به مناطق بین‌ژنی تعلق دارند. این توزیع نشان‌دهنده کیفیت مناسب کتابخانه‌های poly-A enriched و غنی بودن داده‌ها از ترانسکریپت‌های کدکننده پروتئین است.

بررسی مراحل ترانسکریپتومی پس از تلقیح با *N. ditissima*: در این مطالعه، تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA)

بر روی شمارش‌های نرمال‌شده بیان ژن‌ها نشان داد که مؤلفه اول (PC1) حدود ۶۲ درصد از واریانس کل داده‌ها را توضیح می‌دهد و نقش اصلی را در تفکیک نمونه‌ها بر اساس شرط آزمایشی (تلقیح‌شده در مقابل شاهد) ایفا می‌کند (شکل ۲). مؤلفه دوم (PC2) حدود ۱۸ درصد از واریانس کل را پوشش می‌دهد و عمدتاً با زمان نمونه‌برداری (۵، ۱۵ و ۳۰ روز پس از تلقیح) مرتبط است، که منجر به جداسازی نسبی نمونه‌ها درون هر گروه می‌شود. در روز پنجم پس از تلقیح، تفکیک مشخصی میان نمونه‌های تلقیح‌شده و شاهد مشاهده نشد و دو گروه در فضای PCA هم‌پوشانی بالایی داشتند. این مشاهده بیانگر شباهت کلی پروفایل بیان ژنی در مراحل اولیه آلودگی است و می‌تواند نشان‌دهنده تأخیر در فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی گیاه باشد. در روزهای بعدی (۱۵ و ۳۰)، جداسازی نمونه‌ها در PCA واضح‌تر شد که با تغییرات معنادار در بیان ژن‌های مرتبط با مسیرهای دفاعی مطابقت دارد. این نتایج نشان می‌دهد که تغییرات اصلی در الگوی بیان ژن‌ها عمدتاً تحت تأثیر تیمار آلودگی بوده و اثر زمان در مرتبه دوم اهمیت قرار دارد (شکل ۲).

با در نظر گرفتن آستانه آماری $FDR \leq 0.05$ ، در روز پنجم ژنی با بیان افتراقی شناسایی نشد و در روز پانزدهم به ۲۶۹۴

ژن (۱۵۷۸ ژن افزایشی و ۱۱۱۶ ژن کاهش) رسید و در روز سی‌ام بیشینه بود؛ به طوری که ۶۹۹۶ ژن (۲۹۹۴ ژن افزایشی و ۴۰۰۲ ژن کاهش) تغییر بیان معنادار داشتند (جدول ۱). این روند افزایشی بیانگر فعال‌شدن تدریجی و گسترده شبکه‌های پاسخ دفاعی در گذر زمان است.

تحلیل غنی‌سازی عملکردی ژن‌ها (GO enrichment): نتایج تحلیل غنی‌سازی اصطلاحات Gene Ontology

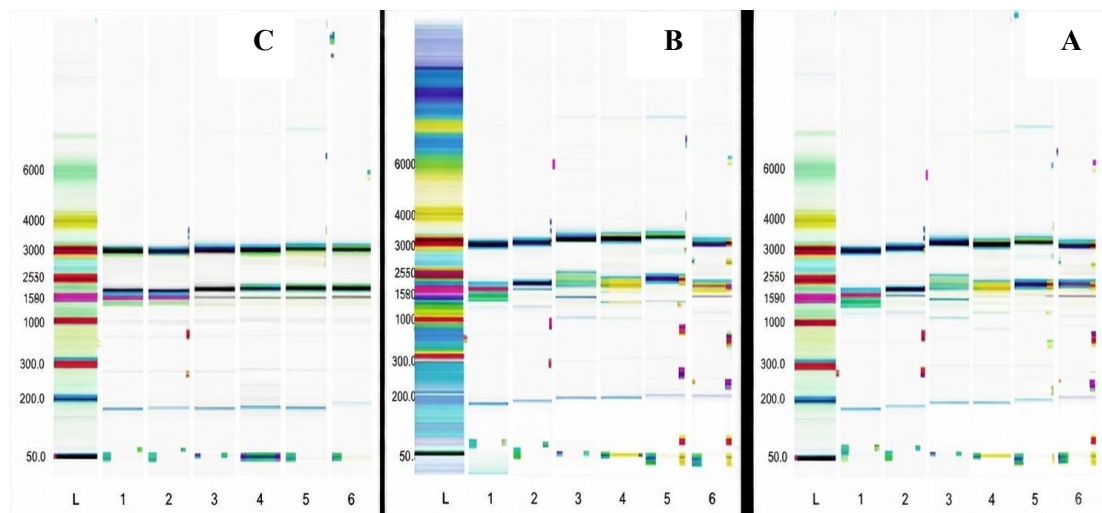
(GO) برای ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs) در روزهای ۱۵ و ۳۰ پس از آلودگی، نشان می‌دهد که چندین دسته‌ی اصلی GO به‌طور معناداری ($P \leq 0.05$, $FDR \leq 0.05$) غنی‌سازی شده‌اند. در هر دو زمان نمونه‌برداری، بیشترین سهم ژن‌ها به دسته‌های اتصال، فعالیت کاتالیتیک و پروسه متابولیک اختصاص داشت که بیانگر نقش غالب فعالیت‌های آنزیمی و متابولیکی در پاسخ به

آلودگی است. شدت غنی‌سازی این دسته‌ها در روز ۳۰ نسبت به روز ۱۵ افزایش یافته است، به‌گونه‌ای که تعداد ژن‌های درگیر بیشتر بوده است. این الگو نشان‌دهنده‌ی تشدید پاسخ‌های متابولیکی و کاتالیتیک گیاه هم‌زمان با پیشرفت عفونت است. در مقابل، در روز ۱۵، دسته‌هایی مرتبط با پاسخ به محرک و سیگنال‌دهی پررنگ‌تر بودند، که با مرحله‌ی اولیه تشخیص پاتوژن و آغاز فعال‌سازی مسیرهای دفاعی سازگار است. به‌طور کلی، تحلیل مبتنی بر نمودار نشان می‌دهد که پاسخ گیاه به عفونت *N. ditissima* ماهیتی پویا دارد و از پاسخ‌های تنظیمی و سیگنال‌دهی اولیه به سمت فعالیت‌های متابولیکی و آنزیمی پایدار در مراحل بعدی تغییر جهت می‌دهد. این نتایج نه‌تنها زمان‌بندی دینامیک پاسخ‌های ژنی را روشن می‌سازد، بلکه مسیرهای مولکولی کلیدی دخیل در سازوکار حساسیت رقم مورد مطالعه را برجسته می‌کند و بستر ارزشمندی برای تحلیل‌های کارکردی آتی و توسعه راهبردهای اصلاحی ژنتیکی فراهم می‌آورد (شکل ۳).

ژن‌های کلیدی در حساسیت رقم سیب: تحلیل ترانسکریپتومی رقم حساس سیب نشان داد که چندین ژن کلیدی

مرتبط با پاسخ‌های دفاعی، سنتز لیگنین، متابولیسم ثانویه و تنظیم تعامل میزبان-پاتوژن، تغییر بیان بسیار معنی داری در پاسخ به آلودگی با *N. ditissima* داشتند. ژن‌های مورد بررسی بر اساس معناداری آماری ($\text{padj} < 0.05$)، مقدار تغییر بیان ($|\log_2\text{FC}| \geq 1$) و تعلق به مسیرهای دفاعی شناخته‌شده انتخاب شدند. در میان این ژن‌ها، *MLO6* که به‌عنوان تنظیم‌کننده منفی دفاع گیاه شناخته می‌شود، افزایش بیان قوی و پایدار نشان داد ($\log_2\text{FC} = +2.49$ ، $\text{padj} \approx 2.46 \times 10^{-10}$ در روز ۱۵؛ $\log_2\text{FC} = +2.84$ ، $\text{padj} \approx 1.21 \times 10^{-14}$ در روز ۳۰) این الگوی بیان با مطالعات پیشین درباره نقش ژن‌های خانواده *MLO* در افزایش حساسیت به پاتوژن‌ها هم‌خوانی دارد (Kusch et al., 2017) و می‌تواند با تسهیل ورود و پیشرفت بیماری در رقم حساس مرتبط باشد. در مقابل، ژن‌های دخیل در سنتز لیگنین و تقویت دیواره سلولی شامل *CAD* ($\log_2\text{FC} = -1.50$ ، $\text{padj} = 0.0001$ در روز ۳۰) و *LAC1* ($\log_2\text{FC} = -0.68$ ، $\text{padj} \approx 0.025$ در روز ۱۵؛ $\log_2\text{FC} = -1.20$ ، $\text{padj} \approx 1.07 \times 10^{-6}$ در روز ۳۰) به‌طور معناداری کاهش بیان داشتند. این کاهش بیان می‌تواند با مسیرهای مرتبط با تقویت دیواره سلولی هم‌ستگی داشته باشد. همچنین، ژن انتقال‌دهنده *ATMRP5* کاهش بیان قابل توجهی نشان داد ($\log_2\text{FC} = -1.50$ ، $\text{padj} \approx 3.87 \times 10^{-6}$ در روز ۳۰) و ژن *ATOMT1* مرتبط با متابولیسم ترکیبات فنولی نیز در هر دو زمان نمونه‌برداری کاهش بیان داشت ($\log_2\text{FC} = -1.2$ ، $\text{padj} \approx 0.037$ در روز ۱۵؛ $\log_2\text{FC} = -1.3$ ، $\text{padj} \approx 0.0038$ در روز ۳۰). ژن دفاع آنزیمی *CHIB1* (کیتیناز پایه‌ای) نیز به‌طور معنی‌داری کاهش بیان نشان داد ($\log_2\text{FC} = -0.69$ ، $\text{padj} \approx 0.008$ در روز ۱۵؛ $\log_2\text{FC} = -1.34$ ، $\text{padj} \approx 2.93 \times 10^{-10}$ در روز ۳۰). علاوه بر این، ژن‌های مرتبط با پاسخ به استرس شامل *GLT1* ($\log_2\text{FC} = -1.53$ ، $\text{padj} = 8.85 \times 10^{-15}$ در روز ۳۰) و *RD2* ($\log_2\text{FC} = -1.26$ ، $\text{padj} = 3.21 \times 10^{-22}$ در روز ۳۰) کاهش بیان قوی نشان دادند، که می‌تواند بیانگر تفاوت در تنظیم مسیرهای پاسخ به استرس در رقم حساس باشد. در مجموع، الگوی هم‌زمان افزایش بیان ژن *MLO6* و کاهش بیان ژن‌های مرتبط با سنتز لیگنین، متابولیسم ثانویه و دفاع آنزیمی (*CHIB1*، *ATOMT1*، *ATMRP5*، *LAC1*، *CAD*)، *GLT1* و *RD2* با معناداری آماری بالا تأیید شد. این نتایج نشان می‌دهد که تغییرات بیان این ژن‌ها با حساسیت رقم مورد مطالعه

به *N. ditissima* همبستگی دارند. با این حال، نقش علیتی این ژن‌ها در بروز حساسیت نیازمند مطالعات عملکردی تکمیلی است. این ژن‌ها می‌توانند به‌عنوان کاندیداهایی برای توسعه نشانگرهای مولکولی مقاومت در برنامه‌های اصلاحی آینده مورد توجه قرار گیرند.



شکل ۱. ارزیابی کیفیت و یکپارچگی RNA استخراج‌شده: (A)، (B) و (C) به ترتیب مربوط به نمونه‌های RNA استخراج‌شده در ۵، ۱۵ و ۳۰ روز پس از آلودگی می‌باشند

Figure 1. Assessment of RNA quality and integrity. Panels (A), (B), and (C) correspond to RNA samples extracted at 5, 15, and 30 days post inoculation, respectively

جدول ۱. ژن‌های متفاوت بیان شده در سه نقطه زمانی در رقم حساس "پریم" ($FDR < 0.05$)

Table 1. Differentially expressed genes at three time points in the susceptible cultivar 'Prima' ($FDR < 0.05$)

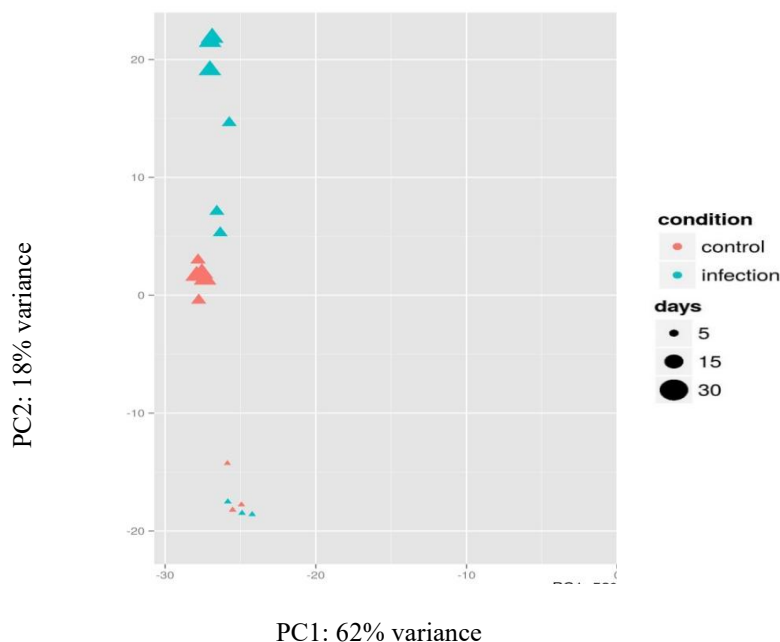
۳۰ روز بعد از آلودگی 30dai		۱۵ روز بعد از آلودگی 15dai		۵ روز بعد از آلودگی 5 dai*	
ژن‌های کاهش بیان شده Down- regulated genes	ژن‌های افزایش بیان یافته Upregulated genes	ژن‌های کاهش بیان شده Down- regulated genes	ژن‌های افزایش بیان یافته Upregulated genes	ژن‌های کاهش بیان شده Down- regulated genes	ژن‌های افزایش بیان یافته Upregulated genes
2994	4002	1116	1578	0	0

* Days after inoculation

بحث

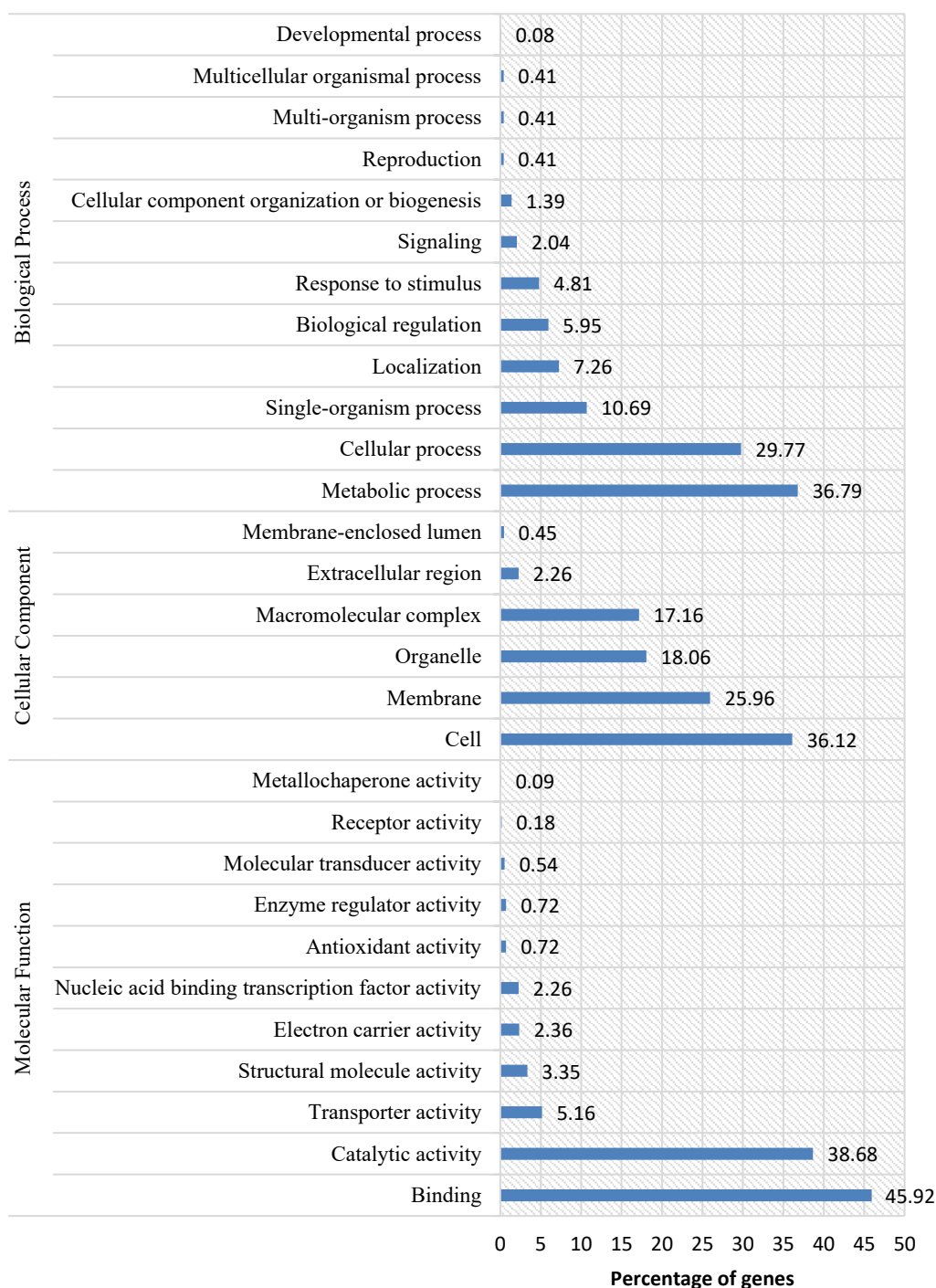
این مطالعه به بررسی پاسخ‌های مولکولی رقم حساس سیب به نام "پریم" به آلودگی با *N. ditissima* پرداخته است. یافته‌های این پژوهش نشان داد که تغییرات بیان ژن مرتبط با پاسخ به آلودگی این پاتوژن در "پریم" عمدتاً در مراحل بعدی عفونت آشکار می‌شود. بیشترین تعداد و شدت تغییرات بیان ژن در ۳۰ روز پس از تلقیح مشاهده شد، در حالی که در روز پنجم تغییرات

معناداری شناسایی نشد که نشان می‌دهد پاسخ‌های دفاعی در سطح ترنسکریپتومی به تدریج و با پیشرفت عفونت شکل می‌گیرند، هرچند پاسخ‌های اولیه ممکن است در سطوح دیگر مانند تنظیم پس‌ترجمه‌ای یا سیگنال‌دهی هورمونی رخ دهند.



شکل ۲. تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) بر روی ژنهای دارای بیان افتراقی (DESeq2) با ۱۸ نمونه از رقم سیب "پریمما" که شامل تیمار شاهد (control) و تلقیح‌شده با *N.ditissima* (infection) در سه زمان نمونه‌برداری ۵، ۱۵ و ۳۰ روز پس از تلقیح. نمونه‌های شاهد با رنگ قرمز و نمونه‌های آلوده با رنگ فیروزه‌ای نمایش داده شده‌اند. مؤلفه اول (PC1) ۶۲٪ از واریانس کل داده‌ها را توضیح می‌دهد و عمدتاً جداسازی نمونه‌ها را بر اساس وضعیت آلودگی در برابر شاهد نشان می‌دهد، در حالی که مؤلفه دوم (PC2) با توضیح ۱۸٪ از واریانس، الگوی تغییرات وابسته به زمان نمونه‌برداری را منعکس می‌کند. هم‌پوشانی نسبی نمونه‌های شاهد و آلوده در روز ۵ بیانگر شباهت پروفایل‌های بیان ژنی در مراحل اولیه آلودگی است، در حالی که جداسازی واضح‌تر نمونه‌ها در روزهای ۱۵ و ۳۰ با تغییرات تدریجی پاسخ میزبان به عفونت قابل مشاهده می‌باشد.

Figure 1. Principal component analysis (PCA) performed on differentially expressed genes identified by DESeq2 using 18 samples of an apple cultivar (Prima), including control and *Neonectria ditissima*-infected tissues, collected at 5, 15, and 30 days post-inoculation (dpi). Control samples are shown in red, whereas infected samples are shown in turquoise. The first principal component (PC1) explains 62% of the total variance and primarily separates samples according to infection status (infected vs. control), while the second principal component (PC2) accounts for 18% of the variance and reflects temporal changes associated with sampling time. The substantial overlap between control and infected samples at 5 dpi indicates similar gene expression profiles at early stages of infection, whereas clearer separation at 15 and 30 dpi is consistent with progressive host transcriptional responses to pathogen infection.



شکل ۳. طبقه‌بندی اصطلاحات Gene Ontology (GO) برای ژن‌های با بیان افتراقی در سطح ۲. نتایج در سه دسته اصلی GO شامل عملکرد مولکولی، اجزا سلولی و فرآیندهای زیستی خلاصه شده‌اند.

Figure 3. Gene Ontology (GO) classification of differentially expressed genes at level 2. The results are summarized into the three main GO categories: molecular function, cellular component, and biological process.

در میان ژن‌های مورد بررسی، *GLT1* (Glutamate Synthase 1) تغییر بیان معناداری در رقم حساس "پریم" نشان داد که بیانگر درگیری مسیرهای مرتبط با متابولیسم نیتروژن در پاسخ به آلودگی با *N. ditissima* می‌باشد. از آنجا که *GLT1* یکی از آنزیم‌های کلیدی در چرخه گلوتامات و تنظیم تعادل نیتروژن سلولی محسوب می‌شود، تغییر بیان این ژن می‌تواند نشان‌دهنده بازتنظیم مسیرهای متابولیسمی میزبان در شرایط تنش زیستی باشد (Qiu et al., 2022). ژن *RD2* نیز کاهش بیان معناداری را در پاسخ به آلودگی نشان داد. ژن‌های خانواده *RD* (Responsive to Dehydration) به‌عنوان اجزای دخیل در پاسخ گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی شناخته می‌شوند و در تنظیم برخی مسیرهای سیگنال‌دهی دفاعی، از جمله مسیر وابسته به اسید سالیسیلیک، نقش دارند (Ding et al., 2013). هم‌زمانی کاهش بیان *RD2* با افزایش پیشرفت بیماری، از مشارکت این ژن در پاسخ میزبان به *N. ditissima* حمایت می‌کند. کاهش بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز لیگنین (*ATOMT1*, *CAD*, *LAC1*) با حساسیت رقم "پریم" به *N. ditissima* همبستگی نشان داد. ژن *CAD* آنزیمی کلیدی در تولید واحدهای لیگنین است و کاهش بیان آن ممکن است با تغییرات ساختاری دیواره سلولی همراه باشد، اختلال هم‌زمان در سه ژن *CAD*، *LAC1* و *ATOMT1* ممکن است یکپارچگی ساختاری و دفاع شیمیایی دیواره‌های سلولی را کاهش داده و تا حدی حساسیت رقم "پریم" به شانکر اروپایی را توضیح دهد. ژن *CHIB1* به‌عنوان یکی از اعضای مهم خانواده کیتینازها، بخشی از سد دفاعی شیمیایی گیاه محسوب می‌شود. این آنزیم با تخریب دیواره سلولی قارچ‌ها، نقش کلیدی در مرحله اولیه دفاع ایفا می‌کند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که افزایش بیان ژن‌های کیتیناز با مقاومت بیشتر به قارچ‌های بیماری‌زا همراه است (Haxim et al., 2022) که این مطالعه بیانگر کاهش در سطح بیان ترنسکریپتی این ژن را نشان داد که می‌تواند با حساسیت این رقم هم‌خوانی داشته باشد. خانواده *MLO* در ابتدا به‌عنوان لوکوس‌های حساسیت به سفیدک پودری شناخته شدند و حذف عملکردشان اغلب باعث ایجاد مقاومت پایدار به این بیماری می‌شود. با این حال، نقش *MLO* ها محدود به سفیدک نیست و مطالعات اخیر نشان داده‌اند که این خانواده در فرآیندهای متنوعی از جمله جابه‌جایی وزیکولی، بازآرایی دیواره سلولی و تنظیم پاسخ‌های ROS و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی دخالت دارند (Kusch & Panstruga 2017). ژن *MLO6* در رقم حساس "پریم" تغییر بیان معناداری در پاسخ به آلودگی با *N. ditissima* نشان داد. این تغییر بیان هم‌زمان با پیشرفت عفونت مشاهده شد که این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده مشارکت این ژن در پاسخ مولکولی رقم حساس به پاتوژن باشد. هرچند در این پژوهش فرآیندهایی مانند سیگنال‌دهی هورمونی، پاسخ‌های ROS یا بازآرایی دیواره سلولی به‌طور مستقیم بررسی نشدند، اما الگوی بیان به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که *MLO6* ممکن است در تنظیم تعادل پاسخ دفاعی میزبان در برابر *N. ditissima* نقش داشته باشد. بنابراین کاهش بیان سه ژن کلیدی *CHIB1*، *ATOMT1* و *MLO6* در رقم حساس "پریم" به تضعیف هم‌زمان سدهای ساختاری، دفاع‌های شیمیایی و تنظیم پاسخ‌های ایمنی منجر می‌شود. هر یک از این ژن‌ها در مسیرهای دفاعی متفاوت اما هم‌پوشان نقش دارند؛ به‌ترتیب در سنتز و رسوب لیگنین به‌عنوان سد فیزیکی و شیمیایی، هیدرولیز دیواره قارچ و تخریب ساختار پاتوژن، و تنظیم تعاملات میکروبی و تعادل ایمنی گیاه. اختلال هم‌زمان در این سه مسیر، اثر هم‌افزایی منفی ایجاد کرده و توان دفاعی گیاه را در برابر *N. ditissima* به‌طور چندلایه تضعیف می‌کند. چنین الگوی چندژنی

می‌تواند بیانگر سازوکارهای مولکولی و بیوشیمیایی زمینه‌ساز حساسیت بالای رقم "پریم" به شانکر اروپایی باشد. از منظر کاربردی، این ژن‌ها ظرفیت بالایی به‌عنوان بیومارکرهای مولکولی برای غربالگری و انتخاب ارقام مقاوم دارند، به شرط آن‌که تعامل آن‌ها با شبکه‌های ژنی همکار و اثرات جانبی احتمالی بر رشد و سایر جنبه‌های مقاومت گیاه نیز به‌دقت ارزیابی شود تا از بروز پیامدهای ناخواسته پیشگیری گردد.

نتیجه‌گیری: تحلیل ترنسکریپتومی رقم حساس "پریم" نشان داد که پاسخ ژنی به آلودگی با *Neonectria ditissima*

شامل تغییرات مشخصی در بیان ژن‌های کلیدی است. به‌طوریکه کاهش بیان ژن‌های مرتبط با سنتز لیگنین (*CAD*, *LAC1*) می‌تواند با تغییرات در استحکام و یکپارچگی دیواره سلولی همبستگی داشته باشد، همچنین کاهش بیان ژن‌های مرتبط با دفاع آنزیمی اولیه (*CHIB1*) و تنظیم ایمنی (*MLO6*, *RD2*) با حساسیت رقم می‌تواند همخوانی داشته باشد. این الگوهای بیان نشان‌دهنده تعامل پیچیده بین مسیرهای دفاعی و ساختاری در پاسخ به عفونت هستند، اما نقش علیتی دقیق این ژن‌ها در حساسیت هنوز نیازمند بررسی‌های عملکردی و آزمایش‌های تکمیلی است، و نیازمند اطلاعات عملکردی مانند فعالیت آنزیمی، سطح لیگنین، پاسخ‌های ROS یا سیگنالینگ هورمونی می‌باشد. با این حال، ژن‌های شناسایی شده می‌توانند به‌عنوان کاندیداهای بالقوه برای توسعه نشانگرهای مولکولی و برنامه‌های اصلاحی مقاومت در مطالعات آینده در نظر گرفته شوند، مشروط بر اینکه اعتبارسنجی آن‌ها در جمعیت‌های گسترده‌تر و با شواهد عملکردی انجام شود. این یافته‌ها چارچوبی اولیه برای درک ژن‌های مرتبط با حساسیت به شانکر اروپایی فراهم می‌کنند و مسیرهای احتمالی برای بررسی‌های تکمیلی را مشخص می‌سازند.

سپاسگزاری: این پژوهش در قالب طرح پژوهشی شماره ۰۳/۸۴۹/ص/۱ با استفاده از اعتبارات پژوهشی پژوهشگاه علوم

و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران انجام شده است. همچنین از شرکت SiLifelab برای توالی‌یابی و کمک مالی در کاهش هزینه‌ها، دکتر لاریسا گوتاسون و پروفیسور هیلده نیوم برای طراحی آزمایش و ارائه نظرهای ساختاری و بیورن کنداک که در آنالیزهای بیوانفورماتیکی کمک نمود تشکر و قدردانی می‌شود.

References

- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-047378-9.X5000-8>
- Ajengui, A., Bertolini, E., Ligorio, A., Chebil, S., Ippolito, A., & Sanzani, S. M. (2018). Comparative transcriptome analysis of two citrus germplasm with contrasting susceptibility to *Phytophthora nicotianae* provides new insights into tolerance mechanisms. *Plant Cell Reports*, 37(3), 483-499. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2244-7>
- Bradshaw, J. E. (2017). Plant breeding: past, present and future. *Euphytica*, 213(3), 60. <https://doi.org/10.1007/s10681-016-1815-y>

- Bus, V. G., Scheper, R. W., Walter, M., Campbell, R. E., Kitson, B., Turner, L., Fisher, B.M., Johnston, S.L., Wu, C., Deng, C.H. & Gardiner, S. E. (2019). Genetic mapping of the European canker (*Neonectria ditissima*) resistance locus Rnd1 from *Malus* 'Robusta 5'. *Tree Genetics & Genomes*, 15(2), 25. <https://doi.org/10.1007/s11295-019-1332-y>
- Denisov, V., Strong, W., Walder, M., Gingrich, J., & Wintz, H. (2008). Development and validation of RQI: an RNA quality indicator for the Experion automated electrophoresis system. *Bio-Rad Bulletin*, 5761. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/BULLETIN_5761B.pdf
- Ding, Y., Liu, N., Virlovet, L., Riethoven, J. J., Fromm, M., & Avramova, Z. (2013). Four distinct types of dehydration stress memory genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 13(1), 229. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-229>
- Du, Z., Zhou, X., Ling, Y., Zhang, Z., & Su, Z. (2010). agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Research*, 38(suppl_2), W64-W70. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq310>
- Haxim, Y., Kahar, G., Zhang, X., Si, Y., Waheed, A., Liu, X., Wen, X., Li, X., & Zhang, D. (2022). Genome-wide characterization of the chitinase gene family in wild apple (*Malus sieversii*) and domesticated apple (*Malus domestica*) reveals its role in resistance to *Valsa mali*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1007936. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1007936>
- Qiu, X. M., Sun, Y. Y., Ye, X. Y., & Li, Z. G. (2020). Signaling role of glutamate in plants. *Frontiers In Plant Science*, 10, 1743. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01743>
- Ghasemkhani, M. (2015a). Resistance against fruit tree canker in apple. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae*, 2015, 77. <https://res.slu.se/id/publ/77464>
- Ghasemkhani, M. (2024). Evaluation of resistance to fruit tree canker caused by *Neonectria ditissima* in apple cultivars. *Research in Pomology*, 9(1). https://rip.urmia.ac.ir/article_121593.html?lang=en
- Ghasemkhani, M., Liljeroth, E., Sehic, J., Zborowska, A., & Nybom, H. (2015b). Cut-off shoots method for estimation of partial resistance in apple cultivars to fruit tree canker caused by *Neonectria ditissima*. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science*, 65(5), 412-421. <https://doi.org/10.1080/09064710.2015.1016101>
- Ghasemkhanni, 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. [10.22103/jab.2024.22780.1543](https://doi.org/10.22103/jab.2024.22780.1543)
- Gómez-Cortecero, A. (2019). The molecular basis of pathogenicity of *Neonectria ditissima*. *Doctoral dissertation*. University of Reading, Reading, UK.
- Gong, P., Kang, J., Sadeghnezhad, E., Bao, R., Ge, M., Zhuge, Y., Shangguan, L. and Fang, J., 2022. Transcriptional profiling of resistant and susceptible cultivars of grapevine (*Vitis*

- L.) reveals hypersensitive responses to *Plasmopara viticola*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 846504. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.846504>
- Karlström, A., Gómez-Cortecero, A., Connell, J., Nellist, C. F., Ordidge, M., Dunwell, J. M., & Harrison, R. J. (2024). Transcriptome analysis reveals candidate genes and provides insights in resistance to European canker in apple. *Research Square*, 1, 1-34. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4423688/v1>
- Karlström, A., Gómez-Cortecero, A., Nellist, C. F., Ordidge, M., Dunwell, J. M., & Harrison, R. J. (2022). Identification of novel genetic regions associated with resistance to European canker in apple. *BMC Plant Biology*, 22(1), 452. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03833-0>
- Kaur, S., Samota, M. K., Choudhary, M., Choudhary, M., Pandey, A. K., Sharma, A., & Thakur, J. (2022). How do plants defend themselves against pathogens-Biochemical mechanisms and genetic interventions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 28(2), 485-504. DOI: 10.1007/s12298-022-01146-y
- Kusch, S., & Panstruga, R. (2017). mlo-based resistance: an apparently universal “weapon” to defeat powdery mildew disease. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(3), 179-189. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-16-0255-CR>
- Liu, X., Li, X., Wen, X., Zhang, Y., Ding, Y., Zhang, Y., Gao, B. & Zhang, D. (2021). PacBio full-length transcriptome of wild apple (*Malus sieversii*) provides insights into canker disease dynamic response. *BMC Genomics*, 22(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07366-y>
- Pessina, S., Angeli, D., Martens, S., Visser, R. G., Bai, Y., Salamini, F., Velasco, R., Schouten, H. J., & Malnoy, M. (2016). The knock-down of the expression of *MdMLO19* reduces susceptibility to powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*) in apple (*Malus domestica*). *Plant Biotechnology Journal*, 14(10), 2033-2044. <https://doi.org/10.1111/pbi.12562>
- Weber, R. W. S. (2014). Biology and control of the apple canker fungus *Neonectria ditissima* (syn. *N. galligena*) from a Northwestern European perspective. *Erwerbs-Obstbau*, 56(3), 95-107. <https://doi.org/10.1007/s10341-014-0210-x>
- Wenneker, M., Goedhart, P. W., Van der Steeg, P., Van de Weg, W. E., & Schouten, H. J. (2017). Methods for the quantification of resistance of apple genotypes to European fruit tree canker caused by *Neonectria ditissima*. *Plant Disease*, 101(12), 2012-2019. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0576-RE>