

Time-Course Gene Expression Analysis in Two Wheat Cultivars Resistant to Fusarium Head Blight and Identification of Hub Genes using Microarray and RNA-Seq Data

1. Zahra Amjadi¹: Plant Protection Department, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
2. Habiballah Hamzehzarghani²: Plant Protection Department, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
3. Zahra Zinati^{3*}: Department of Agroecology, College of Agriculture and Natural Resources of Darab, Shiraz University, Shiraz, Iran
4. Farideh Farahbakhsh⁴: Plant Protection Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources and Education Center, Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Darab, Iran

*Corresponding Author's Email Address: zahrazinati@shirazu.ac.ir

Article Type:

Original Research

Received: 15 November 2025

Revised: 01 February 2026

Accepted: 16 February 2026

How to Cite: Amjadi, Z., Hamzehzarghani, H., Zinati, Z., & Farahbakhsh, F. (2024). Time-Course Gene Expression Analysis in Two Wheat Cultivars Resistant to Fusarium Head Blight and Identification of Hub Genes using Microarray and RNA-Seq Data. *Plant Pathology*, 60(4), 421-442.

DOI: 10.22034/IJPP.2026.2021883.505

Abstract:

Fusarium head blight (FHB), caused by *Fusarium graminearum* species complex (FGSC), is one of the most destructive diseases of wheat in warm and humid regions, particularly when anthesis coincides with heavy rainfall. This study aimed to systematically analyze time-series microarray data to identify co-expression modules, key hub genes, and elucidate the molecular mechanisms underlying wheat's response to FGSC. Gene expression data from two FHB-resistant wheat cultivars, Nyubai and Wuhan 1, were retrieved from the Gene Expression Omnibus (GEO) database. After normalization, batch effects were removed using the ComBat algorithm. Through Gene Correlation Network Analysis (GCNA), 850 genes with significant condition \times time interaction ($FDR < 0.05$) were identified and clustered into two distinct modules containing 448 and 402 genes, respectively, based on stress expression patterns using the k-means algorithm. For each cluster, ten hub genes with the highest connectivity were selected. Cluster 1, characterized by activation of ABC transporters, glutathione metabolism, and MAPK signaling pathways, plays a crucial role in direct defense through chitinase, glucanase, and protease inhibitor genes. Cluster 2 mediates secondary defense responses via kinase and glucosidase genes through involvement in hormonal and systemic signaling pathways. Validation using an independent RNA-Seq dataset confirmed the reliability of these results. These results provide valuable insights into wheat defense mechanisms against FHB and offer candidate genes for future functional studies and resistance marker development.

Keywords: Microarray, Clustering, Defense mechanism, Wheat, *Fusarium graminearum*.



© 2024 the authors. Published by Maher Publishing Institute. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) License.

Extended Abstract

Introduction

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is the third most widely cultivated cereal crop worldwide and constitutes a cornerstone of global food security. Among the major biotic stresses threatening wheat production, Fusarium head blight (FHB) is considered one of the most destructive diseases, particularly in temperate and semi-humid regions. This disease is primarily caused by *Fusarium graminearum* and leads to substantial yield losses, as well as deterioration of grain quality. In addition to its agronomic impact, FHB poses a serious risk to human and livestock health due to the accumulation of mycotoxins, such as deoxynivalenol (DON), which contaminate harvested grains and enter the food chain.

Resistance to FHB is a quantitatively inherited and highly complex trait governed by multiple genetic and physiological mechanisms. These mechanisms include resistance to initial pathogen penetration (type I resistance), restriction of fungal spread within the spike (type II resistance), resistance to kernel infection (type III resistance), tolerance to mycotoxin accumulation (type IV resistance), and resistance associated with yield preservation under infection (type V resistance). Due to this complexity, breeding for durable FHB resistance remains a major challenge in wheat improvement programs.

Advances in high-throughput transcriptomic technologies have revealed that thousands of genes exhibit altered expression in response to FHB infection. These genes are involved in diverse biological processes, including pathogen recognition, signal transduction, cell wall reinforcement, secondary metabolite biosynthesis, and detoxification pathways. Although differential expression analyses have provided valuable insights into individual genes, the coordinated behavior and network organization of these genes during infection remain incompletely understood. Since biological responses to stress are typically regulated through interconnected gene networks rather than

isolated genes, systems-level approaches are required to elucidate the underlying regulatory architecture.

Gene Correlation Network Analysis (GCNA) is a powerful systems biology method that enables the identification of gene modules with highly correlated expression patterns and the detection of highly connected hub genes within these modules. Such hub genes often play central regulatory roles and represent promising targets for functional validation or marker-assisted breeding. Therefore, the present study employed co-expression network analysis of temporal wheat transcriptomic data following *F. graminearum* infection to identify pathogen-responsive gene clusters and key hub genes associated with FHB resistance. The ultimate aim of this research was to provide candidate genes and molecular networks that could be exploited for genetic improvement and the development of reliable biomarkers for FHB resistance.

Methods and Materials

Gene expression data were obtained from two publicly available microarray datasets, GSE54552 and GSE54553, deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database. These datasets comprise transcriptomic profiles of two FHB-resistant wheat cultivars, NuyBay and Wuhan1, following inoculation with *Fusarium graminearum*. Samples were collected at 1, 2, and 4 days post-infection (dpi), along with corresponding non-infected control samples.

Raw microarray data were preprocessed and normalized using the Robust Multi-array Average (RMA) algorithm to ensure comparability across samples. To eliminate systematic non-biological variation between the two datasets, batch effects were corrected using the ComBat function implemented in the sva package in R. The effectiveness of batch correction was assessed by principal component analysis (PCA).

To identify genes exhibiting time-dependent responses to pathogen infection, a linear modeling approach was applied. The model incorporated the effects of cultivar, treatment condition (infected versus control), time point, and their interactions. Genes showing a statistically significant

interaction between infection condition and time (false discovery rate [FDR] < 0.05) were considered differentially responsive and selected for subsequent network analyses.

The selected genes were clustered based on their expression patterns under infection conditions using the k-means clustering algorithm. The optimal number of clusters was determined using silhouette width and elbow criteria. For each cluster, a gene correlation network was constructed using Pearson correlation coefficients between gene expression profiles, with a correlation threshold of ≥ 0.7 . The weighted connectivity (degree) of each gene within the network was calculated, and up to ten genes with the highest connectivity in each cluster were designated as hub genes.

Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses were performed for each cluster to identify overrepresented biological processes and signaling pathways. To validate the robustness of the identified hub genes, an independent RNA-Seq dataset (GSE113128) related to wheat response to *F. graminearum* infection was used for cross-validation.

Findings

Application of the ComBat method effectively removed batch effects between the GSE54552 and GSE54553 datasets. PCA results demonstrated a clear convergence of sample distributions and a marked improvement in biological separation between infected and control samples, indicating successful normalization and correction.

A total of 850 genes exhibited significant interactions between infection condition and time (FDR < 0.05) and were selected for downstream analyses. These genes displayed dynamic expression patterns over the course of infection, suggesting their involvement in temporal defense responses.

Based on silhouette and elbow analyses, the optimal number of clusters was determined to be two. Cluster 1 consisted of 448 genes, while cluster 2 comprised 402 genes. In both clusters, the average gene expression levels under infection conditions showed an increasing trend compared with control samples, although the temporal patterns differed between clusters.

Within each cluster, the ten genes with the highest connectivity were identified as hub genes. In cluster 1, hub genes included well-characterized defense-related genes such as chitinases (e.g., *Ta.2278.2.S1_x_at*), β -1,3-glucanase (*Ta.22562.1.S1_at*), Bowman–Birk protease inhibitors (BBI), and the autophagy-related gene *ATG8*. Cluster 2 hub genes included glucan endo-1,6- β -glucosidase, arabinogalactan protein, flavanone 3-dioxygenase, serine/threonine protein kinases, and uridine nucleosidase 2. Notably, a substantial proportion of hub genes in both clusters lacked functional annotation, highlighting the presence of potentially novel components in FHB resistance networks.

KEGG pathway enrichment analysis revealed that key defense-related pathways, including MAPK signaling and plant–pathogen interaction pathways, were significantly enriched in both clusters. Cluster 1 showed specific enrichment in glutathione metabolism and ABC transporter pathways, which are associated with detoxification processes. In contrast, cluster 2 was uniquely enriched in plant hormone signal transduction pathways, reflecting its role in regulatory and signaling functions.

Cross-validation using an independent RNA-Seq dataset confirmed the differential expression of seven out of the twenty identified hub genes, supporting the reliability and biological relevance of the network-based findings.

Discussion and Conclusion

This study employed a systems-level approach to elucidate the molecular networks underlying wheat resistance to Fusarium head blight. Through co-expression analysis of temporal transcriptomic data, two major gene clusters with distinct yet complementary roles in defense responses were identified.

Cluster 1 primarily encompassed genes involved in direct defense and detoxification mechanisms corresponding to type I to III resistance. The presence of chitinases and β -1,3-glucanases among its hub genes underscores the importance of cell wall-degrading enzymes in inhibiting fungal penetration and early colonization. The identification of

Bowman–Birk protease inhibitors suggests a role in suppressing fungal proteolytic activity, thereby further limiting pathogen invasion. Moreover, enrichment of glutathione metabolism and ABC transporter pathways highlights the involvement of this cluster in mycotoxin detoxification and export, which is critical for reducing DON accumulation.

Cluster 2 appeared to function predominantly in secondary defense responses and signaling coordination. Hub genes such as glucan endo-1,6- β -glucosidase likely contribute to pathogen-associated molecular pattern (PAMP) recognition and basal immune activation. Flavanone 3-dioxygenase, a key enzyme in flavonoid biosynthesis, is associated with the production of antifungal phytoalexins. The prominence of serine/threonine protein kinases and the enrichment of hormone signaling pathways indicate that cluster 2 plays a central role in integrating hormonal and MAPK-mediated signaling cascades to orchestrate systemic defense responses.

The complementary nature of these two clusters suggests that effective FHB resistance arises from the coordinated action of localized defense mechanisms and broader regulatory networks. The presence of uncharacterized hub genes further implies that novel resistance components remain to be functionally explored.

In conclusion, this study demonstrates that wheat resistance to *Fusarium* head blight is governed by an interconnected network of gene modules involved in both direct defense and systemic signaling responses. The identification and validation of key hub genes provide valuable candidates for future functional studies, such as gene silencing or overexpression analyses. Furthermore, these genes represent promising targets for the development of molecular markers in breeding programs. By integrating multiple resistance mechanisms through pyramiding of complementary genes from distinct defense networks, it may be possible to develop wheat cultivars with stable, durable, and multifaceted resistance to FHB. Such advances would contribute significantly to sustainable agriculture and long-term food security.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest in conducting the present study.

Ethical Considerations

All ethical principles and standards were fully observed in the conduct of this research.

Acknowledgments

The authors would like to express their sincere gratitude to all those who contributed to the various stages of this study.

تحلیل زمانی بیان ژن در دو رقم گندم مقاوم به بلایت فوزاریومی خوشه و شناسایی ژن‌های کانونی با استفاده از داده‌های ریز آرایه و RNA-Seq

۱. زهرا امجدی^{ID}: گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
 ۲. حبیباله حمزه‌زرقانی^{ID}: گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
 ۳. زهرا زبیتی^{ID}: گروه آگرواکولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی داراب، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
 ۴. فریده فرحبخش^{ID}: بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، داراب، ایران
- *پست الکترونیک نویسنده مسئول: zahrazinati@shirazu.ac.ir

نوع مقاله:

چکیده

پژوهشی اصیل

بیماری بلایت فوزاریومی خوشه، ناشی از گونه مرکب *Fusarium graminearum*، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های گندم در مناطق گرم و مرطوب است که هم‌زمانی دوره گلدهی با بارندگی‌های شدید، شدت خسارت آن را تشدید می‌کند. این مطالعه با هدف تحلیل سیستماتیک داده‌های ریز آرایه زمانی جهت شناسایی ژن‌های کانونی کلیدی، خوشه‌های هم‌بیان، و درک سازوکارهای مولکولی پاسخ گندم به این بیماری انجام شد. داده‌های ریز آرایه بیان ژن دو رقم گندم مقاوم، نیوبای (Nyubai) و ووهان ۱ (Wuhan 1)، از پایگاه داده بیان ژن GEO (Gene Expression Omnibus) استخراج و پس از نرمال‌سازی اثر دسته‌ای (Batch effect) آن‌ها با استفاده از الگوریتم ComBat حذف گردید. سپس با بهره‌گیری از تحلیل شبکه همبستگی ژنی (Gene Correlation Network Analysis)، ۸۵۰ ژن با برهم‌کنش معنی‌دار شرایط مایه‌زنی × زمان ($FDR < 0.05$) شناسایی و بر اساس الگوهای بیان در شرایط تنش توسط الگوریتم k-means در دو خوشه متمایز ۴۴۸ و ۴۰۲ ژنی گروه‌بندی شدند. در نهایت، ۱۰ ژن کانونی با بیشترین درجه اتصال برای هر خوشه تعیین شد. آنالیز غنی‌سازی نشان داد خوشه یک با فعال‌سازی مسیرهای انتقال‌دهنده‌های ABC، متابولیسم گلوکوتایون و پیام‌رسانی MAPK نقش کلیدی در دفاع مستقیم از طریق ژن‌های کیتیناز، گلوکاناز و مهارکننده‌های پروتئاز ایفا می‌کند. در مقابل خوشه دو با مشارکت در مسیرهای پیام‌رسانی هورمونی و سیستمیک از طریق ژن‌های کیناز و گلوکوزیداز پاسخ دفاعی ثانویه را واسطه‌گری می‌نماید. اعتبارسنجی با داده‌های RNA-Seq مستقل نیز صحت نتایج را تأیید کرد. یافته‌های این پژوهش مبنای ارزشمندی برای مطالعات عملکردی آینده و توسعه نشانگرهای مولکولی مقاومتی فراهم می‌کند.

کلیدواژه‌گان: ریز آرایه، گندم، خوشه‌بندی، سازوکار دفاعی، *Fusarium graminearum*

تاریخ دریافت: ۲۴ آبان ۱۴۰۴

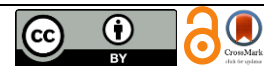
تاریخ بازنگری: ۱۲ بهمن ۱۴۰۴

تاریخ پذیرش: ۲۷ بهمن ۱۴۰۴

نحوه استناددهی: امجدی، زهرا، حمزه‌زرقانی، حبیب‌الله، زبیتی، زهرا، و فرحبخش، فریده. (۱۴۰۳). تحلیل زمانی بیان ژن در دو رقم گندم مقاوم به بلایت فوزاریومی خوشه و شناسایی ژن‌های کانونی با استفاده از داده‌های ریز آرایه و RNA-Seq. *بیماری‌های گیاهی*، ۶۰(۴)، ۴۲۱-۴۴۲.

DOI:

10.22034/IJPP.2026.2021883.505



مجوز و حق نشر: © ۱۴۰۳ تمامی حقوق انتشار این مقاله متعلق به نویسنده است. انتشار این مقاله توسط انتشارات ماهر به صورت دسترسی آزاد مطابق با گواهی (CC BY 4.0) صورت گرفته است.

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum*) به عنوان سومین غله از لحاظ سطح زیر کشت، نقش محوری در تامین امنیت غذایی جهانی دارد (Bertassello et al., 2023). بلایت فوزاریومی خوشه (*Fusarium head blight*) که با نام اسکب خوشه (*head scab*) نیز شناخته می‌شود، اغلب توسط گونه‌ی مرکب *Fusarium graminearum* ایجاد می‌شود. این بیماری نه تنها به کاهش عملکرد محصول منجر می‌شود، بلکه با تولید قارچ‌زهرهایی مانند دئوکسینوالنول (*Deoxynivalenol*) نیز می‌تواند سلامت انسان و دام را تهدید کند (Ma et al., 2025).

آلودگی گندم به بیماری بلایت فوزاریومی خوشه عمدتاً در مرحله گلدهی رخ می‌دهد، زمانی که آسکوسپورها و کنیدیوم‌ها در شرایط مرطوب (رطوبت نسبی بالا یا بارندگی‌های مداوم) و دمای بالا همراه با مدت طولانی خیس بودن خوشه‌ها جوانه می‌زنند. قارچ از طریق منافذ طبیعی یا کوتیکول به گل‌های گندم نفوذ می‌کند. در طول این فرآیند، قارچ با ترشح آنزیم‌های تجزیه‌کننده کوتیکول، دیواره سلولی و تولید قارچ‌زهرها آلودگی اولیه را بوجود می‌آورد. سفید شدن سنبله‌ها، تجمع میسلیم‌های صورتی رنگ روی هر سنبله، تولید اجسام تیره (پریتسیوم) روی سنبله‌های آلوده و نهایتاً ایجاد دانه‌های چروکیده و سفید رنگ از علائم بیماری بلایت فوزاریومی خوشه هستند که آن را از سایر بیماری‌های قارچی طوقه و پوسیدگی گندم متمایز می‌کنند (Al-Hashimi et al., 2025).

مقاومت به بلایت فوزاریومی خوشه در گندم یک صفت کمی پیچیده است و توسط پنج ساز و کار مختلف کنترل می‌شود: مقاومت نوع I (مقاومت در برابر نفوذ اولیه)، از جوانه‌زنی اسپورها و نفوذ ریشه‌های قارچ به بافت میزبان از طریق مکانیسم‌هایی مانند تولید پراکسید هیدروژن، بسته شدن روزنه‌ها و تقویت دیواره سلولی جلوگیری می‌کند (Zhang et al., 2012). مقاومت نوع II (محدود کردن گسترش بیماری در خوشه) از انتشار بیمارگر

از سنبله‌های آلوده به محور خوشه و سایر سنبله‌ها ممانعت می‌کند (Xu et al., 2022). مقاومت نوع III (مهار تجمع قارچ‌زهرها) با تجزیه یا تغییر ساختار سموم قارچی در دانه، تجمع آنها را مهار می‌کند (Bai et al., 2001). مقاومت نوع IV (کاهش آلودگی دانه) با مکانیسم‌های مشابه مقاومت نوع I تا نوع III آلودگی دانه را کاهش می‌دهد (Gong et al., 2020). مقاومت نوع V (تحمل به بیماری) بدون مهار مستقیم بیمارگر، تحمل گیاه به کاهش عملکرد ناشی از بیماری را افزایش می‌دهد (Ma et al., 2020). تا به امروز، صدها جایگاه صفت کمی در گندم و خویشاوندان آن شناسایی شده‌اند که ژن‌های غالب آنها هنوز کلون نشده‌اند. علاوه بر این، بسیاری از ژن‌های مرتبط با مقاومت به بلایت فوزاریومی خوشه از نظر عملکردی مشخص شده‌اند و عملکردهای بیولوژیکی آنها اخیراً بررسی شده است. در میان جایگاه‌های صفت کمی، نه ژن (*Fhb1-Fhb9*) رسماً نامگذاری شده‌اند. با این حال، تنها ژن‌های مربوط به *Fhb1* و *Fhb7*، که هر کدام تأثیر عمده‌ای بر مقاومت به بلایت فوزاریومی خوشه دارند، به صورت موضعی همسانه‌سازی شده‌اند (Ma et al., 2025).

مطالعات بیان ژن‌ها نشان داده‌اند که بیان ژن هزاران ژن در پاسخ به آلودگی فوزاریوم تغییر می‌کند و مسیرهای پیام‌رسانی هورمونی، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و بازسازی سلولی در این پاسخ درگیر هستند (Al-Hashimi et al., 2025). با این حال، درک هماهنگی زمانی و شبکه‌ای میان این واکنش‌های ژنی یعنی اینکه کدام مجموعه‌های ژنی به صورت هم‌زمان و سازمان‌یافته فعال یا سرکوب می‌شوند و کدام ژن‌ها نقش محوری یا کانونی را در هماهنگ‌سازی پاسخ بر عهده دارند، هنوز ناقص است.

تحلیل شبکه همبستگی ژنی (*Gene Correlation Network Analysis=GCNA*) یک روش بیوانفورماتیکی است که با محاسبه همبستگی‌های زوجی بین ژن‌ها و تبدیل آن‌ها به یک شبکه همبستگی ژنی و شناسایی ژن‌های کانونی (پُراهمیت)، به درک بهتر سازوکارهای مولکولی و

هر حالت (در مجموع ۱۲ نمونه) تولید شده بود (Kosaka et al., 2015). مجموعه داده GSE54553 نیز الگوی بیان ژنهای مربوط به رقم مقاوم ووهان ۱ (Wuhan 1) در شرایط مشابه و بازه‌های زمانی یکسان شامل می‌شد، اما با طرح تکرار متفاوت (یک تکرار برای روز اول و دو تکرار برای روزهای دوم و چهارم پس از آلودگی و در مجموع ۱۰ نمونه) (Long et al., 2015). نرمال‌سازی کوانتیلی برای حذف تفاوت‌های فنی بین چپ‌ها به کار گرفته شد. در این روش، مقادیر سیگنال فلورسانس پروب‌ها در هر نمونه برحسب رتبه مرتب شدند و برای هر رتبه میانگین مقادیر میان همه نمونه‌ها جایگزین شد تا توزیع سیگنال‌ها یکسان شود. سپس ادغام مقادیر پروب با روش تعدیل میانه (median polish) در چارچوب RMA انجام شد. تمامی محاسبات و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی در محیط نرم‌افزار R نسخه (4.5.1) اجرا شدند.

تصحیح اثر دسته‌ای و بررسی توزیع نمونه‌ها

از آنجا که نمونه‌ها از دو مطالعه مختلف بودند، با استفاده از تابع ComBat از بسته sva (J. Zhang et al., 2020) اثر دسته‌ای حذف شد. باکس پلات‌های مقدار بیان برای هر نمونه قبل و بعد از ComBat (رنگ‌ها بر اساس مبدأ مطالعه) رسم شدند تا تغییر توزیع‌ها بررسی شود. همچنین آنالیز مولفه اصلی (Principal Component Analysis = PCA) برای ارزیابی حذف اثر دسته‌ای انجام شد. یکی از محدودیت‌های این مطالعه نابرابر بودن تعداد تکرارهای زیستی بین مجموعه‌های داده استفاده شده است؛ به‌ویژه GSE54553 در برخی نقاط زمانی تنها یک تکرار دارد. هرچند از ComBat برای تصحیح اثرات دسته‌ای و از روش empirical Bayes بسته limma برای تثبیت برآوردهای واریانس استفاده شد، شاید این تدابیر نتوانند به‌طور کامل اثرات کاهش توان آماری یا پتانسیل افزایش نرخ اشتباه چندآزمونی ناشی از نمونه‌بندی نامتوازن را حذف کنند. بنابراین نتایج مربوط به ژن‌هایی که در مرز آستانه‌ی FDR قرار دارند باید با احتیاط تفسیر شوند. در آینده، افزایش

کشف ژن‌های کلیدی کمک می‌کند (Stuart et al., 2003). اگرچه مطالعات تفصیلی ترانسکریپتومیک تاکنون اطلاعات ارزشمندی در این باره فراهم کرده‌اند، شکاف مهمی در شناسایی خوشه‌های هم‌بیانی و ژن‌های کانونی که نقش مرکزی در تنظیم پاسخ به تنش را ایفا می‌کنند، باقی مانده است. تعیین این خوشه‌ها و کانون‌ها می‌تواند به درک بهتر ساختار شبکه دفاعی گندم و کشف اهداف بالقوه برای اصلاح ژنتیکی یا توسعه نشانگرهای زیستی برای تشخیص زود هنگام بیماری کمک کند (Sari et al., 2019).

در این پژوهش، با بهره‌گیری از داده‌های زمانی ترانسکریپتوم گندم آلوده به *F. graminearum*، از شبکه ژنی مبتنی بر همبستگی برای شناسایی الگوهای هماهنگ بیان و استخراج ژن‌های کانونی هر خوشه استفاده شد. این مطالعه الگوهای زمانی پاسخ دفاعی در ارقام مقاوم گندم نیوبای (Nyubai) و ووهان ۱ (Wuhan 1) پس از آلودگی را شناسایی و توصیف می‌کند، با تأکید بر ژن‌هایی که بین شرایط تنش و کنترل الگوهای زمانی متفاوتی نشان می‌دهند. در نهایت نیز خوشه‌های پاسخ دهنده به فوزاریوم و ژن‌های کانونی مهم برای مطالعات عملکردی به‌عنوان نشانگرهای مقاومت در برنامه‌های اصلاحی معرفی می‌گردند.

مواد و روش‌ها

داده‌ها

برای انجام بررسی حاضر، مجموعه داده‌های بیان ژن با شناسه‌های GSE54552 و GSE54553 از پایگاه عمومی داده بیان ژن GEO (Gene Expression Omnibus) استخراج و مورد استفاده قرار گرفت. مجموعه داده GSE54552 حاوی پروفایل‌های ریزآرایه Affymetrix از خوشه‌های رقم گندم بهاره مقاوم به بیماری نیوبای (Nyubai) بود که با هدف مقایسه الگوهای بیان ژن در پاسخ به آلودگی با قارچ عامل بیماری در مقایسه با تیمار شاهد (آب)، در سه زمان ۱، ۲ و ۴ روز پس از مایه‌زنی و با دو تکرار برای

تعداد تکرارها یا اعتبارسنجی تجربی ژن‌های منتخب در نمونه‌های مستقل می‌تواند اطمینان بیشتری در مورد پایداری این نتایج فراهم آورد.

شناسایی ژن‌های دارای برهم‌کنش

برای هر ژن یک مدل خطی با فرمول $expression \sim cultivar + class$ Time × برازش شد. داده‌ها از دو مطالعه مستقل که هر یک بر روی یک رقم متفاوت انجام شده بودند با همدیگر ترکیب شدند و رقم به عنوان یک عامل ثابت (Fixed effect) به منظور کنترل تفاوت‌های زمینه‌ای ژنتیکی بین مطالعات، در مدل گنجانده شد. در این مدل، class نشان‌دهنده‌ی شرایط آزمایش (مایه‌زنی شده با بیمارگر یا آب) و Time نشان‌دهنده‌ی بازه‌های زمانی (۱، ۲ و ۴ روز پس از مایه‌زنی بود). برازش مدل با بسته‌ی limma (Ritchie et al., 2015) انجام شد. مقادیر p مربوط به برهم‌کنش class × Time استخراج شد و تصحیح چندآزمونی با روش Benjamini-Hochberg انجام گردید. ژن‌هایی که $FDR < 0.05$ داشتند به‌عنوان ژن‌های دارای برهم‌کنش معنی‌دار انتخاب شدند. هدف ما یافتن الگوهای مشترک پاسخ به تنش در طول زمان (اثر class و برهم‌کنش class × Time) که در هر دو رقم دیده می‌شود بود. برای تمرکز بر این پاسخ‌های عمومی، رقم (cultivar) را به صورت یک عامل ثابت جهت کنترل تفاوت‌های ژنتیکی زمینه‌ای بین دو مطالعه وارد مدل کردیم تا اختلاف‌های پایه‌ای بین ارقام حذف شود. لازم به ذکر است که شناسایی پاسخ‌های اختصاصی هر رقم هدف مرحله اول نبود. برهم‌کنش سه‌طرفه (cultivar × class × Time) که نشان‌دهنده وابستگی پاسخ time × class به رقم است، نیازمند درجه آزادی و توان آماری بیشتری است و به‌خاطر نابرابری تکرارها و تعداد کم نمونه‌ها ممکن است منجر به برآوردهای ناپایدار شود. بنابراین مدل اصلی گزارش شده ساده‌تر انتخاب شد تا برآوردها پایداری بیشتری داشته باشند و الگوهای مشترک بهتر مشخص گردند.

ساخت الگوهای زمانی (تفکیک نمونه‌های مربوط به بیماری و شاهد)

برای هر ژن انتخاب‌شده ($FDR < 0.05$)، میانگین بیان در هر بازه زمانی به‌صورت جداگانه برای نمونه‌های گروه مایه‌زنی شده با بیمارگر و گروه شاهد محاسبه شد. در نتیجه برای هر ژن دو سری زمانی به‌دست آمد: یکی برای گروه مایه‌زنی شده با بیمارگر و دیگری برای گروه شاهد. خوشه‌بندی زمانی مبتنی بر میانگین‌های گروه مربوط به بیماری انجام شد و روندهای گروه شاهد برای مقایسه نگهداری شدند.

خوشه‌بندی ژن‌ها بر اساس روندهای زمانی در گروه مربوط به بیماری

خوشه‌بندی ژن‌ها بر روی ماتریس میانگین بیان در هر زمان برای نمونه‌های مایه‌زنی شده با بیمارگر با استفاده از الگوریتم k-means (Hartigan & Wong, 1979) انجام شد و تعداد خوشه‌ها با استفاده از روش آرنج (Elbow) (Kodinariya & Makwana 2013) و شاخص سیلوهوت (Silhouette) (Rousseeuw, 1987) ارزیابی و به‌صورت ترکیبی انتخاب شد.

شبکه‌سازی داخل هر خوشه و محاسبه‌ی مرکزیت

برای هر خوشه، شبکه‌ای از ژن‌ها با استفاده از نمونه‌های گروه مایه‌زنی شده با بیمارگر ساخته شد. ماتریس همبستگی پیرسون (Pearson Correlation Matrix) بین زوج ژن‌ها محاسبه شد. وزن هر یال (edge) برابر مقدار مطلق همبستگی قرار گرفت. اتصالات (یال‌ها) با مقدار مطلق همبستگی کمتر از ۰/۷ حذف شدند. گراف وزن‌دار از ماتریس مجاورت تولید شد و برای هر ژن مقدار درجه اتصال (weighted degree) به‌عنوان مجموع وزن‌های یال‌های متصل به آن محاسبه گردید (Stuart et al., 2003) (فایل تکمیلی). تصاویر شبکه همبستگی ژنی مربوط به هر خوشه نیز در فایل تکمیلی ارائه شده‌اند.

انتخاب کانونی‌ها

در هر خوشه، ده ژن با بالاترین درجه اتصال (تعداد اتصالات هر ژن در شبکه) به‌عنوان ژن‌های کانونی انتخاب شدند. برای هر ژن کانونی، تغییر بیان

امجدی و همکاران: تحلیل زمانی بیان ژن در دو رقم گندم مقاوم به بلایت فوزاریومی خوشه و...

و HC374 و رقم حساس به بیماری Shaw) پس از مایه‌زنی با قارچ با استفاده از فناوری RNA-Seq بررسی شده است. ژن‌های کانونی شناسایی شده در این مطالعه با استفاده از پایگاه ژنوم انسمبل گیاهی (Ensembl Plants) به ژن‌های مربوطه در مجموعه داده RNA-Seq نقشه برداری شدند.

نتایج

به منظور اطمینان از اینکه الگوهای استخراج‌شده‌ی بیان ژن، بازتاب‌دهنده‌ی پاسخ‌های زیستی گندم به آلودگی فوزاریومی باشند و نه تفاوت‌های تکنیکی بین مطالعات، ابتدا وجود اثرات دسته‌ای ناشی از منبع نمونه‌ها بررسی شد. بررسی‌های اولیه نشان داد که داده‌های خام تحت تأثیر تفاوت‌های سیستماتیک بین مطالعات قرار دارند که می‌تواند تفسیر نتایج زیستی را مخدوش کند. برای رفع این مسئله، در گام نخست، اثرات تکنیکی ناشی از منبع نمونه با استفاده از روش ComBat حذف گردید. مقایسه‌ی باکس‌پلات‌ها قبل و بعد از تصحیح نشان داد که پیش از اصلاح، توزیع مقادیر بیان ژن بین دسته‌ها (دو مطالعه) تفاوت محسوسی داشت، در حالی که پس از اعمال ComBat این تفاوت‌ها به‌طور قابل توجهی کاهش یافتند (شکل ۱).

بین نمونه‌های تنش و کنترل به‌صورت $\log_2(\text{fold change})$ محاسبه گردید. مقادیر $\log_2\text{FC}$ سپس برای هر ژن به نمره Z (Z-score) تبدیل شد تا تغییرات نسبی بین نمونه‌ها قابل مقایسه باشد. برای نمایش واضح‌تر الگوهای افزایش و کاهش بیان بین شرایط، نقشه حرارتی بر پایه مقادیر استانداردشده (Z-score) ترسیم شد.

آنالیز هستی‌شناسی و مسیر

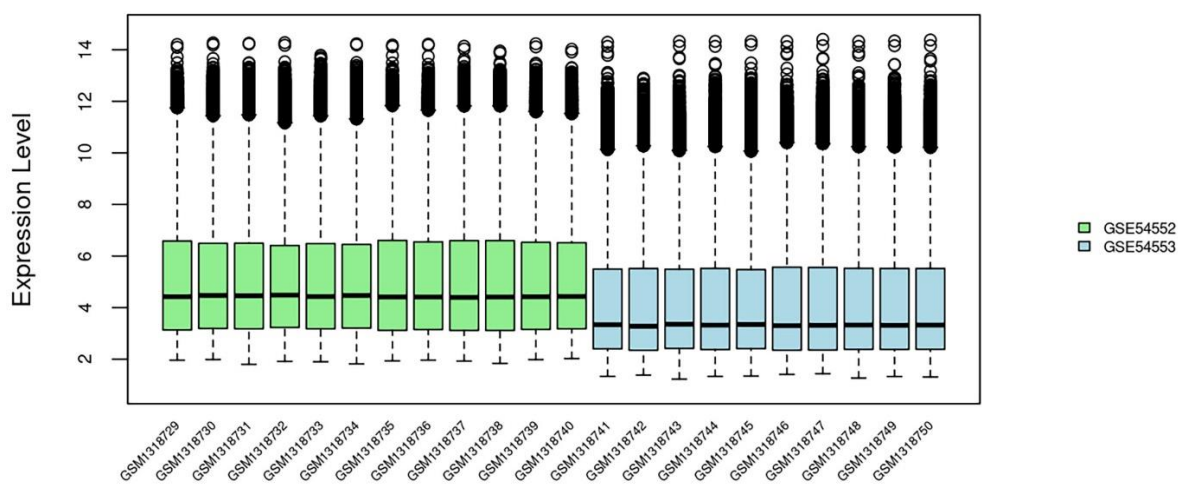
آنالیز غنی‌سازی هستی‌شناسی ژن (Gene ontology) و مسیر براساس پایگاه داده دانشنامه کیوتو از ژن‌ها و ژنوم (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes = KEGG) با استفاده از شناسه‌های ژن‌ها با بیان افتراقی برای هر خوشه انجام شد.

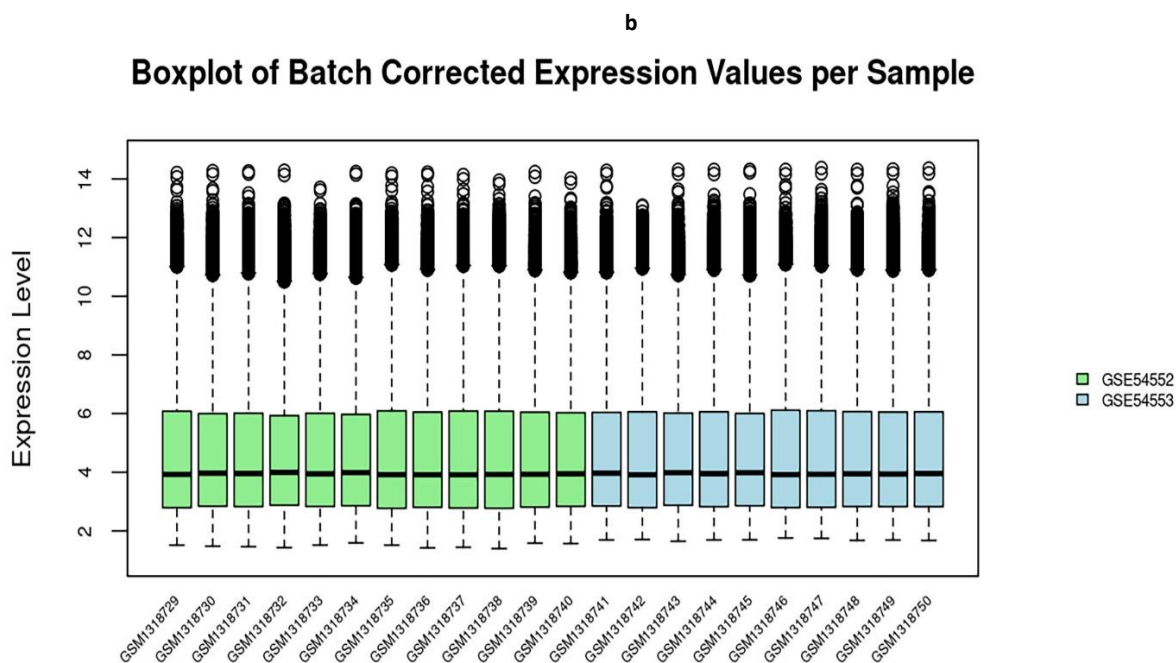
اعتبارسنجی متقابل ژن‌های کانونی

برای اعتبارسنجی متقابل ژن‌های کانونی مطالعه حاضر، از یک مجموعه داده RNA-Seq (GSE113128) مربوط به پاسخ گندم به بیماری بلایت فوزاریومی خوشه استفاده شد (Pan et al., 2018). در مطالعه پن و همکاران (Pan et al., 2018)، پاسخ ترانسکریپتومیکس چهار ژنوتیپ گندم (ارقام/لاین‌های مقاوم به بیماری نیوبای و ووهان ۱ و نسل بعدی منتج از آنها

a

Boxplot of Original Expression Values per Sample





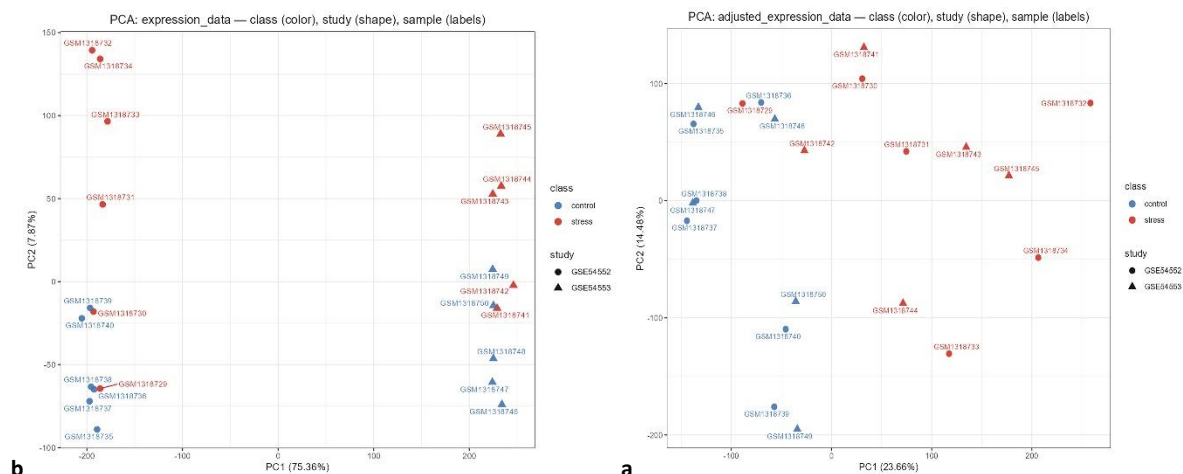
شکل ۱. (a) توزیع مقادیر بیان ژن در پاتوسیستم گندم-*Fusarium graminearum* پیش از تصحیح که اختلاف سیستماتیک (اثر دسته‌ای) بین دو مطالعه GSE54552 (رقم NuyBay به رنگ سبز) و GSE54553 (رقم Wuhan1 به رنگ آبی) را نشان می‌دهد. (b) توزیع یکنواخت شده داده‌ها پس از تصحیح اثر دسته‌ای که قابلیت مقایسه‌پذیری را بهبود بخشیده است.

Figure 1. (a) Distribution of gene expression values in wheat-*Fusarium graminearum* pathosystem before correction, showing systematic differences (batch effect) between the two studies GSE54552 (green) and GSE54553 (blue). (b) Uniform distribution of data after correction for the batch effect, which improves comparability.

در مجموع، این نتایج نشان می‌دهد که تصحیح اثر دسته‌ای برای آشکارسازی الگوهای واقعی بیان ژن در پاسخ گندم به آلودگی فوزاریومی ضروری بوده و داده‌های اصلاح شده مبنای قابل‌اعتمادتری برای تحلیل‌های بعدی شامل شناسایی ژن‌های برهم‌کنش‌دار، خوشه‌بندی زمانی و تحلیل شبکه فراهم می‌کنند.

تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) نیز این بهبود را تأیید کرد. پیش از تصحیح، مؤلفه‌ی اول (PC1) ۷۵/۳۶٪ از واریانس کل داده‌ها را توضیح می‌داد و نمونه‌ها عمدتاً بر اساس مطالعه‌ی مبدأ از یکدیگر جدا می‌شدند. پس از حذف اثر دسته‌ای، سهم PC1 به ۲۳/۷٪ کاهش یافت و هم‌زمان جداسازی زیستی بین نمونه‌های مایه‌زنی‌شده با بیمارگر و نمونه‌های شاهد واضح‌تر شد. همچنین نمونه‌های متعلق به مطالعات مختلف در فضای PCA هم‌پوشانی بیشتری نشان دادند (شکل ۲).

امجدی و همکاران: تحلیل زمانی بیان ژن در دو رقم گندم مقاوم به بلایت فوزاریومی خوشه و...



شکل ۲. تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) برای بررسی توزیع نمونه‌های زیستی در پاتوسیستم گندم-*Fusarium graminearum* قبل از تصحیح اثر دسته‌ای (a) و پس از تصحیح اثر دسته‌ای (b) ارائه شده است. داده‌ها مربوط به دو مطالعه مستقل شامل GSE54552 (رقم NuyBay، نشان داده شده با ●) و GSE54553 (رقم Wuhan1، نشان داده شده با ▲) هستند. نتایج نشان می‌دهد که اعمال تصحیح اثر دسته‌ای موجب کاهش تفکیک ناشی از منبع مطالعه و افزایش همپوشانی نمونه‌ها بر اساس ویژگی‌های زیستی شده است.

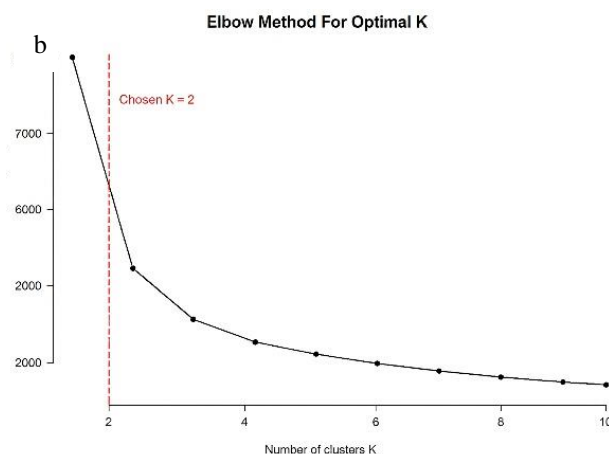
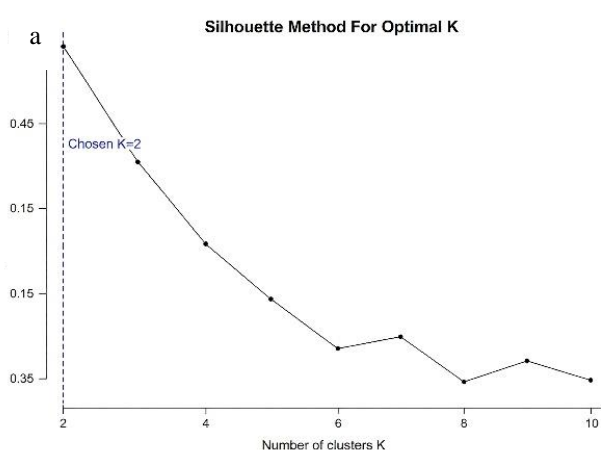
Figure 2. Principal component analysis (PCA) was performed to examine the distribution of biological samples in the wheat-*Fusarium graminearum* pathosystem before batch effect correction (a) and after batch effect correction (b). The data originate from two independent studies: GSE54552 (cultivar NuyBay, indicated by ●) and GSE54553 (cultivar Wuhan1, indicated by ▲). The results show that batch effect correction reduced study-driven variation and increased the overlap of samples based on their biological characteristics.

در روش آرنج مجموع مربعات درون‌خوشه‌ای (Within-Cluster Sum of Squares = WSS) برای مقادیر k از ۱ تا ۱۰ محاسبه و نمودار مربوطه رسم گردید (شکل ۳). در این نمودار کاهش چشمگیر WSS از $k = 1$ به $k = 2$ وجود دارد و پس از $k = 2$ ، نرخ کاهش WSS به‌طور قابل توجهی کند می‌شود؛ بنابراین آرنج در $k = 2$ قرار دارد. نقطه انتخاب‌شده با یک خط نقطه‌چین قرمز مشخص شده است. این الگوی کاهش تند اولیه به معنی آن است که افزایش k فراتر از ۲ تنها کاهش نسبتاً کمی در WSS به همراه دارد و بنابراین پیچیدگی مدل با افزایش خوشه‌ها توجیه‌پذیر نیست. خوشه‌بندی k -means منجر به تشکیل دو خوشه شامل خوشه یک با ۴۴۸ ژن و خوشه دو با ۴۰۲ ژن مجزا شد (شکل ۳). مقایسه روند میانگین

از میان ژن‌های بررسی‌شده، ۸۵۰ ژن با توجه به معنی‌دار شدن اثر متقابل شرایط آزمایش \times زمان ($FDR < 0.05$) به عنوان ژن‌های کلیدی انتخاب و برای خوشه‌بندی مورد استفاده قرار گرفتند. با استفاده از دو معیار سیلهوت و آرنج، مقدار $k=2$ به عنوان تعداد بهینه خوشه تعیین شد که حاکی از وجود دو الگوی متمایز در داده‌ها می‌باشد. میانگین شاخص سیلهوت برای مقادیر k از ۲ تا ۱۰ محاسبه شد (شکل ۳). بیشترین مقدار میانگین شاخص سیلهوت (حدود ۰/۵) در $k = 2$ مشاهده شد که با یک خط نقطه‌چین آبی در نمودار نشان داده شده است. میانگین شاخص سیلهوت در $k = 2$ نشان‌دهنده همگن بودن نسبی اعضای هر خوشه و تفکیک‌پذیری منطقی بین خوشه‌ها است؛ با افزایش k میانگین شاخص سیلهوت به تدریج کاهش می‌یابد که کیفیت خوشه‌بندی را پایین‌تر نشان می‌دهد.

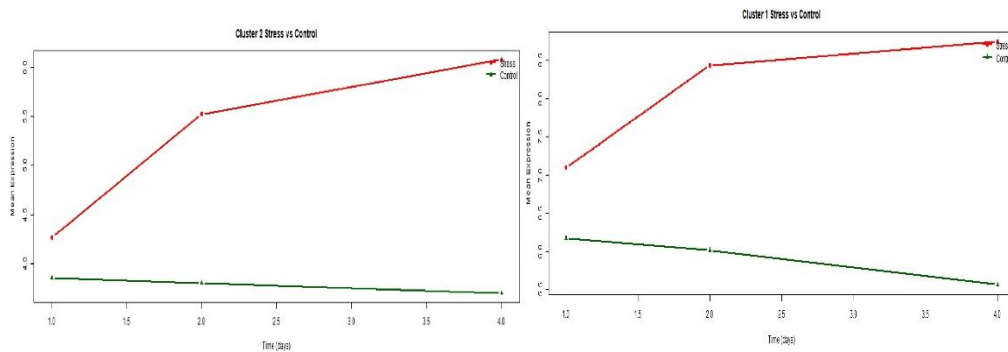
تغییرات نسبی بین نمونه‌ها قابل مقایسه باشد. برای نمایش واضح‌تر الگوهای افزایش و کاهش بیان بین شرایط، نقشه حرارتی بر پایه مقادیر استاندارد شده (Z-score) ترسیم شد. نقشه حرارتی ژن‌های کانونی، تعییرات بیان در نمونه‌های مایه زنی شده با بیمارگر در مقایسه با شاهد را در سه زمان ۱، ۲ و ۴ روز پس از مایه‌زنی نشان می‌دهد (شکل ۵).

بیان ژن‌ها در شرایط مایه‌زنی شده با بیمارگر و شاهد مربوط به هر خوشه‌ی در شکل ۴ نشان داده شده است. در هر خوشه، ده ژن با بالاترین درجه اتصال (degree؛ تعداد اتصالات هر ژن در شبکه) به‌عنوان ژن‌های کانونی انتخاب شدند. برای هر کانونی، تغییر بیان بین نمونه‌های تنش و کنترل به‌صورت $\log_2(\text{fold change})$ محاسبه گردید. مقادیر $\log_2\text{FC}$ سپس برای هر ژن به نمره Z (Z-score) تبدیل شد تا



شکل ۳. انتخاب تعداد بهینه خوشه‌ها (k) بر اساس روش سیلوئت (a) و آرنج (b). هر دو روش به طور مستقل نشان می‌دهند که تعداد بهینه خوشه‌ها برابر با ۲ است. بر اساس روش سیلوئت، مقدار $k=2$ به دلیل داشتن بیشترین میانگین عرض سیلوئت به عنوان تعداد بهینه انتخاب شد. بر اساس روش آرنج، مقدار $k=2$ به دلیل کاهش شدید مجموع مربعات درون‌خوشه‌ای (WSS) تا این نقطه و سپس کاهش کندتر پس از آن، به عنوان تعداد بهینه انتخاب شد.

Figure 3. Selection of the optimal number of clusters (k) based on the silhouette method (a) and the elbow method (b). Both methods independently show that the optimal number of clusters is 2. Based on the silhouette method, the value $k = 2$ was chosen as the optimal number due to the largest average silhouette width. Based on the elbow method, the value $k = 2$ was chosen as the optimal number due to the sharp decrease in the within-cluster sum of squares (WSS) up to this point and then a slower decrease thereafter.



شکل ۴. روند میانگین بیان ژن‌ها در شرایط تنش و شاهد برای خوشه‌های ۱ (a) و ۲ (b). در هر خوشه، میانگین بیان ژن‌ها در شرایط مایه‌زنی با *Fusarium graminearum* (خط قرمز) با گذر زمان افزایش یافته، در حالی که در شرایط شاهد (خط سبز) کاهش یا ثبات ملایم مشاهده می‌شود. این الگو نشان‌دهنده افزایش بیان ژن‌ها تحت شرایط تنش نسبت به شاهد در بازه‌های زمانی مورد بررسی است. این افزایش بیان نشان‌دهنده فعال شدن پاسخ‌های زیستی دفاعی در گندم تحت تنش قارچی است.

Figure 4. Temporal profiles of mean gene expression under stress and control conditions for clusters 1 (a) and 2 (b). In each cluster, mean gene expression under *Fusarium graminearum* inoculation (red line) increased over time, whereas under control conditions (green line) it either decreased or remained relatively stable. This pattern indicates upregulation of genes under stress compared to control across the examined time points. The observed upregulation reflects activation of defense-related biological responses in wheat under fungal stress.

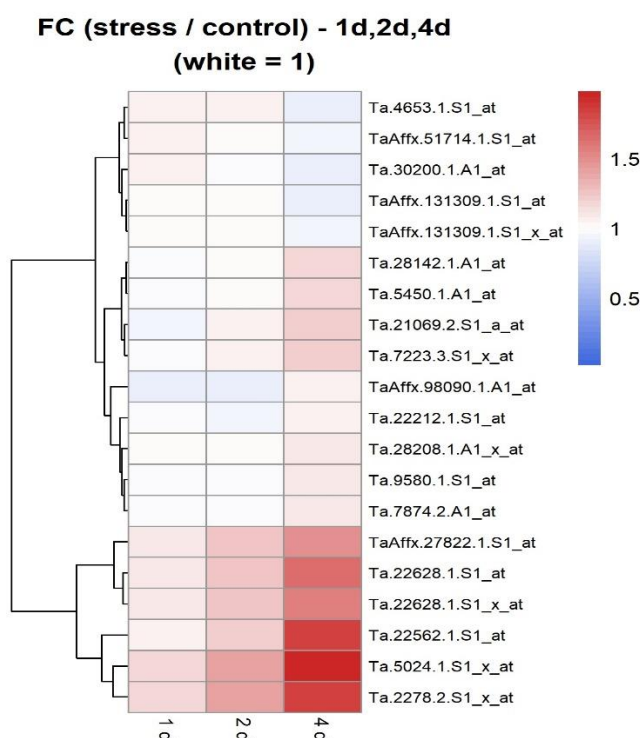
نتایج بلاست نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن‌های کانونی مربوط به خوشه یک با ژن‌های سایر گیاهان نشان داد که پنج تا از این ژن‌ها شامل *Ta.22628.1.S1_at*، *Ta.22628.1.S1_x_at*، *Ta.28208.1.A1_x_at*، *Ta.7874.2.A1_at* و *Ta.5024.1.S1_x_at* هستند. همچنین، نتایج بلاست نوکلئوتیدی و پروتئینی این ژن‌ها با ژن‌های گندم نشان داد که ژن *TaAffx.131309.1.S1_x_at* با ژن‌های کد کننده شبه‌فروکتوکیناز ۱ و ۲ (-1-fructokinase or -2-fructokinase-like)، ژن *Ta.2278.2.S1_x_at* با ژن‌های کد کننده کیتیناز ۴، ۵ و ۶ (like chitinase 4-like or -5-like or -6-like)، ژن *Ta.22562.1.S1_at* (glucan endo-1,6-beta-glucosidase A) یا گلوکان اندو-۱-۶-بتا-گلوکوزیداز (glucan endo-1,6-beta-glucosidase B) ژن *Ta.21069.2.S1_a_a t* اغلب با ژن کد کننده پروتئین آرآینوگالاکتان فاسیکلین مانند ۸ (fasciclin-like) و ژن *Ta.30200.1.A1_at* با ژن کد کننده پروتئین آرآینوگالاکتان فاسیکلین مانند ۸ (fasciclin-like) و ژن *TaAffx.27822.1.S1_at* اغلب با ژن کد کننده مهارکننده‌های بومن-بیرک

نتایج بلاست نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن‌های کانونی مربوط به خوشه دو با ژن‌های سایر گیاهان نشان داد که چهار تا از این ژن‌ها شامل *Ta.22212.1.S1_at* و ژن *Ta.22212.1.S1_at* (Bowman-Birk inhibitors=BBI) پروتئین مرتبط با اتوفاژی ۸ (Autophagy-related protein = ATG8h) همولوژی دارند.

نتایج بلاست نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن‌های کانونی مربوط به خوشه دو با ژن‌های سایر گیاهان نشان داد که چهار تا از این ژن‌ها شامل *Ta.28142.1.A1_at*، *TaAffx.98090.1.A1_at*، *Ta.4653.1.S1_at* و *TaAffx.51714.1.S1_at* دارای عملکرد ناشناخته و سایر ژن‌ها هر کدام دارای یک عملکرد احتمالی هستند. نتایج بلاست نوکلئوتیدی و پروتئینی این ژن‌ها با ژن گندم نیز نشان داد که ژن *Ta.21069.2.S1_a_a t* اغلب با ژن کد کننده گلوکان اندو-۱-۶-بتا-گلوکوزیداز (glucan endo-1,6-beta-glucosidase A) یا گلوکان اندو-۱-۶-بتا-گلوکوزیداز (glucan endo-1,6-beta-glucosidase B) ژن *Ta.30200.1.A1_at* با ژن کد کننده پروتئین آرآینوگالاکتان فاسیکلین مانند ۸ (fasciclin-like) و ژن *TaAffx.27822.1.S1_at* اغلب با ژن کد کننده مهارکننده‌های بومن-بیرک

نتایج هستی‌شناسی ژن‌ها با بیان افتراقی، برای خوشه‌های یک و دو بررسی شد. این نتایج نشان می‌دهند که ژن‌های هر خوشه در کارکردهای مولکولی، اجزای سلولی و فرایندهای بیولوژیکی مختلف نقش دارند. یافته‌ها به ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ ارائه شده‌اند و اطلاعات دقیقی درباره مسیرها و عملکردهای غالب ژن‌ها در هر خوشه ارائه می‌کنند.

ژن *Ta.7223.3.S1_x_at* (arabinogalactan protein 8, FLA8 کد کننده فلاونون ۳-دی‌اکسیژناز ۲-مانند (flavanone 3-dioxygenase) 2-like)، ژن *TaAffx.131309.1.S1_at* اغلب با ژن کد کننده فروکتوکیناز ۱ و ۲ (fructokinase-2-like or fructokinase-1-like)، ژن *Ta.9580.1.S1_at* با یوریدین نوکلئوزیداز ۲ و ژن *Ta.5450.1.A1_at* با پروتئین کیناز سرین/ترئونین همولوژی دارد (فایل تکمیلی).



شکل ۵. نقشه حرارتی تغییرات بیان ژن‌های کانونی در ارقام گندم (Wuhan 1 و Nyubai) مایه‌زنی شده با قارچ *Fusarium graminearum* در زمان ۱، ۲ و ۴ روز پس از مایه زنی. هر ردیف نقشه حرارتی نمایانگر یک ژن کانونی است. به طوری که رنگ قرمز افزایش بیان و رنگ آبی کاهش بیان را نسبت به نمونه‌های کنترل نشان می‌دهد. مقیاس رنگی در کنار نقشه حرارتی نمایش داده شده است تا میزان تغییر بیان به صورت دقیق قابل مشاهده باشد.

Figure 5. Heatmap of changes in the expression of hub genes in wheat cultivars (Nyubai and Wuhan 1) inoculated with *Fusarium graminearum* at 1, 2 and 4 days after infection expression change, with red representing upregulation and blue representing downregulation compared to control samples. A color scale is provided alongside the heatmap to allow quantitative interpretation of Each row corresponds to a hub gene. Color intensity indicates the level of gene expression changes.

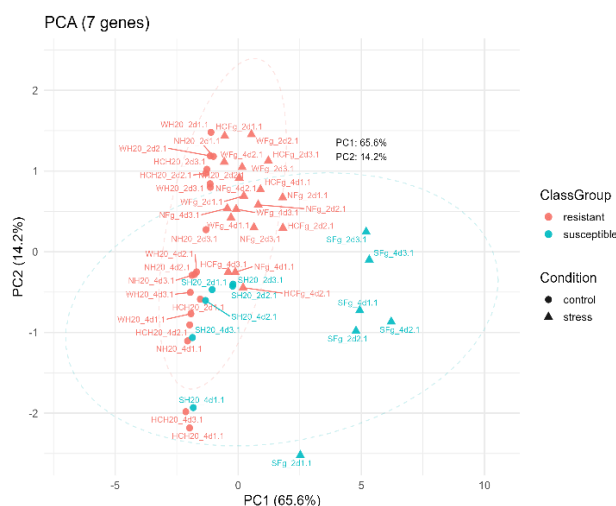
گلوتاتیون (Glutathione metabolism) (P -value : 0.000913)، مسیر پیام‌رسانی MAPK (MAPK signaling pathway) (P -value : 0.0013)، متابولیسم قند آمینه و قند نوکلئوتیدی (Amino sugar and nucleotide)

آنالیز غنی‌سازی مسیر KEGG روی ژن‌ها با بیان افتراقی در خوشه یک، پنج مسیر مهم شامل مسیرهای انتقال دهنده‌های ABC (ATP-binding cassette) (ABC) transporters (P -value : 0.000872)، متابولیسم

امجدی و همکاران: تحلیل زمانی بیان ژن در دو رقم گندم مقاوم به بلایت فوزاریومی خوشه و...

ژن شامل *Ta.5024.1.S1_x_at* (ناشناخته)، *Ta.2278.2.S1_x_at* (کیتیناز)، *Ta.21069.2.S1_a_at* (گلوکان اندو-۶،۱-بتا-گلوکوزیداز)، *Ta.4653.1.S1_at* (ناشناخته)، *TaAffx.131309.1.S1_at* (فروکتوکیناز)، *Ta.5450.1.A1_at* (پروتئین کیناز سرین/ترئونین) و *Ta.9580.1.S1_at* (یوریدین نوکلئوزیداز) با ژن‌های موجود در مجموعه داده RNA-Seq با *P-value* های بسیار معنی داری متناظر بودند. آنالیز PCA نشان داد که این ۷ ژن می‌توانند به خوبی نمونه‌های حساس را از نمونه‌های مقاوم جدا کنند (شکل ۶). نتایج آنالیز PCA می‌تواند تأییدی بر اهمیت ژن‌های کانونی شناسایی شده در این پژوهش باشد.

(sugar metabolism) (P -value : 0.00694) و برهمکنش گیاه-بیمارگر (Plant-pathogen interaction) (P -value : 0.0442) نشان داد. در خوشه دو نیز سه مسیر معنی‌دار شامل مسیر پیام‌رسانی MAPK (P -value : 0.00294). برهمکنش گیاه-بیمارگر (P -value : 0.0113) و انتقال پیام هورمون‌های گیاهی (Plant hormone signal transduction) (P -value : 0.0324) مشخص شد. اعتبارسنجی متقابل ۲۰ ژن کانونی شناسایی شده در دو خوشه مطالعه حاضر با استفاده از یک مجموعه داده RNA-Seq (GSE113128) مربوط به پاسخ گندم به بیماری بلایت فوزاریومی خوشه نشان داد که ۷ ژن از این ۲۰



شکل ۶. آنالیز مولفه‌های اصلی (PCA) بر پایه بیان ۷ ژن همسان‌شده (*Ta.5024.1.S1_x_at*، *Ta.2278.2.S1_x_at*، *Ta.21069.2.S1_a_at*).

بین داده‌های ریزآرایه مطالعه حاضر و مجموعه RNA-Seq مستقل (*Ta.4653.1.S1_at*، *TaAffx.131309.1.S1_at*، *Ta.5450.1.A1_at* و *Ta.9580.1.S1_at*) (GSE113128). نقاط نمونه‌ها براساس حساس (آبی)، مقاوم (قرمز)، شرایط کنترل (دایره) و شرایط آلوده (مثلث) رنگ‌گذاری شده‌اند. محورهای PC1 و PC2 به ترتیب ۶۵/۶٪، ۱۴/۲٪ و ۷۹/۸٪ از واریانس کل را توضیح می‌دهند. آنالیز نشان می‌دهد که بیان این مجموعه کوچک ژنی قادر به تفکیک نمونه‌های حساس از مقاوم است. تفکیک گروه‌ها توسط این هفت ژن، اعتبارسنجی متقابل نتایج ما را تقویت می‌کند.

Figure 6. Principal component analysis (PCA) based on the expression of seven aligned genes (*Ta.5024.1.S1_x_at*, *Ta.2278.2.S1_x_at*, *Ta.21069.2.S1_a_at*, *Ta.4653.1.S1_at*, *TaAffx.131309.1.S1_at*, *Ta.5450.1.A1_at*, and *Ta.9580.1.S1_at*) across the microarray data from the present study and an independent RNA-seq dataset (GSE113128). Sample points are colored according to susceptibility (blue) and resistance (red), and shaped according to control conditions (circles) and inoculated conditions (triangles). PC1 and PC2 explain 65.6% and 14.2% of the total variance, respectively (79.8% in total). The analysis indicates that the expression of this small gene set is capable of discriminating susceptible from resistant samples. The separation of groups by these seven genes strengthens the cross-validation of our results.

بحث

بلایت فوزاریومی خوشه (بلایت فوزاریومی خوشه) که عمدتاً توسط قارچ نیمه زیوپارور *Fusarium graminearum* ایجاد می‌شود، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های گندم در سراسر جهان است. چالش اصلی در مدیریت این بیماری، ماهیت کمی و پیچیده مقاومت به آن است که توسط شبکه‌ای از سازوکارهای مقاومت (انواع I تا V) کنترل می‌شود. اگرچه مطالعات ترانسکریپتومیک متعددی ژن‌های متعددی را در پاسخ به بلایت فوزاریومی خوشه شناسایی کرده‌اند، اما درک ما از ساختار شبکه‌ای، هماهنگی زمانی و ژن‌های کلیدی (کانونی) که این پاسخ پیچیده را هدایت می‌کنند، هنوز ناقص است. این پژوهش با بهره‌گیری از تحلیل شبکه همبستگی ژنی بر روی داده‌های ترانسکریپتومی زمانی، گامی فراتر از فهرست‌سازی ژن‌ها با بیان افتراقی برداشته و به کشف الگوهای هم‌بیانی و ژن‌های محوری در این شبکه پرداخته است. خوشه‌بندی روی ۸۵۰ ژن دارای برهم‌کنش معنادار زمان \times شرایط، منجر به شناسایی دو خوشه (خوشه) اصلی شامل خوشه یک با ۴۸ ژن و خوشه دو با ۴۰۲ ژن با روندهای بیان متمایز شد.

آنالیز هستی‌شناسی، مسیرها و بررسی نقش ژن‌های کانونی در خوشه

یک

آنزیم‌های کیتیناز (*Ta.2278.2.S1_x_at*) و بتا-۱،۳-گلوکاناز (*Ta.22562.1.S1_at*) به عنوان پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی *PR-3* و *PR-2* شناخته می‌شوند. این آنزیم‌ها به ترتیب کیتین و گلوکان، اجزای ساختاری کلیدی دیواره سلولی قارچ را تجزیه می‌کنند (Mahajan et al., 2025). در این مطالعه افزایش معنی‌دار تدریجی بیان این ژن‌ها تا روز چهارم (شکل ۶) در خوشه یک، به احتمال زیاد می‌تواند نشان‌دهنده یک پاسخ دفاعی قوی و مستمر برای محدود کردن نفوذ و گسترش قارچ در بافت میزبان است. در مطالعه‌ای دو ژن کد کننده کیتیناز (*PR3*) و بتا-۱،۳-گلوکاناز (*PR2*) به

طور جداگانه در گندم بیش از حد بیان شده‌اند و افزایش مقاومت به بلایت فوزاریومی خوشه در گلخانه مشاهده شد (Anand et al., 2003). هم‌بیانی این دو ژن، در مطالعات دیگر روی ارقام مقاوم ایرانی و برزیلی گندم نیز گزارش شده، یک راهبرد دفاعی هم‌افزایی قوی را ایجاد می‌کند (Mahajan et al., 2025; Mendes et al., 2025; Mohammadzadeh-Heydari et al., 2024).

در این مطالعه آنالیز هستی‌شناسی فعال شدن اندوکیتینازها، کیتینازها و تجزیه کیتین را به طور معنی‌داری در فرایندهای بیولوژیکی در خوشه یک نشان می‌دهد (جدول ۱). مطالعات متعدد نشان می‌دهد که در مراحل اولیه آلودگی، بیان ژن‌های دفاعی مانند کیتینازها و گلوکانازها که با مقاومت نوع I (مقاومت در برابر گسترش اولیه بیماری) مرتبط است افزایش می‌یابد و اغلب با القای مسیرهای پیام‌رسانی اسید سالیسیک همراه است (Sirangelo, 2024). از طرف دیگر فعالیت آنزیم‌های کیتیناز و گلوکاناز نه تنها منجر به تخریب مستقیم دیواره قارچ می‌شود، بلکه قطعات تجزیه‌شده به عنوان الگوهای مولکولی مرتبط با بیمارگر (*PAMPs*) شناسایی می‌شوند. این مولکول‌ها توسط گیرنده‌های تشخیص الگو (*PRRs*) در گیاه شناسایی شده و منجر به فعال شدن ایمنی ناشی از الگوهای مولکولی (*PTI*) می‌شوند. در گندم، پروتئین‌های متصل‌شونده به کیتین به عنوان *PRR* عمل کرده و با اتصال به *PAMPs*، مسیرهای پیام‌رسانی دفاعی از جمله مسیر کیتینازهای فعال‌شده با میتوزن (*MAPK*) را فعال می‌کنند. فعال شدن این مسیر، پاسخ‌های دفاعی پایه از جمله بیان ژن‌های *PR* را القا می‌کند (Mahajan et al., 2025). در این مطالعه مسیر پیام‌رسانی *MAPK* از جمله مسیرهای معنی‌دار شناسایی شده در خوشه یک می‌باشد. تمام این شواهد نشان دهنده نقش برجسته این کانونی ژن‌ها (کیتینازها و گلوکانازها) در سطح مولکولی است.

مهارکننده‌های بومن-بیرک (*BBI*) (*TaAffx.27822.1.S1_at*) از مهارکننده‌های پروتئاز نوع سرین هستند که علاوه بر نقش حیاتی آن در تنظیم

فوزاریومی خوشه در خوشه یک بود. همچنین آنالیز هستی‌شناسی نشان داد که فعالیت گلوکاتایون ترانسفراز و فرایند تجزیه گلوکاتایون به ترتیب از معنی-دارترین کارکردهای مولوکولی و فرایندهای بیولوژیکی برای خوشه یک هستند (جدول ۱). در مطالعه پن و همکاران گلوکاتایون S-ترانسفراز به عنوان یک ژن کانونی در سه ژنوتیپ مقاوم گندم معرفی شد (Pan et al., 2018).

افزایش سطح اعضای خانواده گلوکاتایون S-ترانسفراز خاص در گندم و جو در ارتباط با مقاومت به بلایت فوزاریومی خوشه مشاهده شده است. مسیر متابولیسم گلوکاتایون در گندم یک سیستم دفاعی چندوجهی در برابر بلایت فوزاریومی خوشه است. خنثی‌سازی تنش اکسیداتیو ناشی از سم قارچ، سم‌زدایی مستقیم یا غیرمستقیم قارچ‌زهرها، تنظیم و تقویت سیگنال‌دهی دفاعی گیاه و پشتیبانی از سنتز ترکیبات ضدقارچ (فیتوآلکسین‌ها) از جمله کارکردهای آن است (Michlmayr et al., 2025). انتقال دهنده‌های ABC در خروج قارچ‌زهرها به خارج سلول و همچنین انتقال هورمون‌های مرتبط با دفاع از جمله سالیسیک اسید نقش دارند (Ma et al., 2025). این مسیرها نه تنها به عنوان شاخص‌های قابل اعتماد برای مقاومت نوع III محسوب می‌شوند، بلکه هدفی امیدبخش در برنامه‌های به‌نژادی برای توسعه ارقام مقاوم گندم به بلایت فوزاریومی خوشه هستند.

با بررسی نقش کانونی ژن‌ها، مسیرها و آنالیز هستی‌شناسی به نظر می‌رسد خوشه یک احتمالاً با تولید مستقیم عوامل ضد قارچی (کیتینازها، گلوکانازها و BBI) در جلوگیری از نفوذ و آلودگی اولیه در مقاومت نوع I، مرگ برنامه ریزی شده سلول (ژن ATG8) در مقاومت نوع II و سم‌زدایی قارچ‌زهرها (از طریق تجزیه گلوکاتایون و دفع آن با انتقال دهنده ABC) در مقاومت نوع III نقش دارد.

پروتئازهای درون‌زا در طول رشد دانه، در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی مختلف نیز القا می‌شود (Bashir et al., 2025; Xie et al., 2021). در مطالعه حاضر بیان این ژن بتدریج پس از مایه‌زنی افزایش داشته و بیشترین افزایش مربوط به ۴ روز پس از مایه‌زنی است. در گندم، مطالعات نقشه‌برداری ژنتیکی، ژن‌های BBI احتمالی را به عنوان کاندیدهایی برای مقاومت گیاهیچه در برابر لکه برنزه (Juliana et al., 2018) و بلایت فوزاریومی خوشه (Sari et al., 2019) شناسایی کردند که با مهار پروتئازهای ترشح شده توسط قارچ (مانند آنزیم‌های تجزیه‌کننده کوتین و دیواره سلولی)، توانایی بیمارگر در نفوذ و کسب مواد مغذی را مختل می‌کنند (Xie et al., 2021). شناسایی آن به عنوان یک ژن کانونی، نقش بالقوه مهم آن در مقاومت به بلایت فوزاریومی خوشه را برجسته می‌سازد و به نظر می‌رسد این ژن هم با ممانعت از توانایی بیمارگر در نفوذ، در مقاومت نوع I دخیل است.

ژن ATG8 (*Ta.22212.1.S1_at*) مرتبط با اتوفازی است در مطالعه حاضر بیشترین افزایش بیان ژن مربوط به ۴ روز پس از مایه‌زنی است. این ژن در گندم، توسط تنش‌های غیرزیستی مختلف مانند شوری و خشکسالی فعال می‌شود و همچنین به تنش‌های زیستی ناشی از عوامل بیماری‌زای قارچی مانند سفیدک پودری پاسخ می‌دهند. در دانه‌های گندم، اتوفازی، از جمله فعالیت ATG8، با توسعه و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی پریکارپ، لایه بیرونی دانه، مرتبط است (Zhang et al., 2020). از آنجایی که مقاومت نوع II با محدود کردن بیمارگرها در ارتباط است، ممکن است ژن ATG8 در القا مقاومت نوع II در ارتباط باشد.

در مقاومت نوع III ژن‌های UDP-گلیکوزیل ترانسفرازها، گلوکاتایون S-ترانسفراز، و انتقال دهنده ABC به عنوان نماینده در نظر گرفته می‌شوند (Sirangelo, 2024). در این مطالعه مسیرهای متابولیسم گلوکاتایون و انتقال دهنده ABC از معنی‌دارترین مسیرهای دفاعی در پاسخ گندم به بیماری بلایت

آنالیز هستی‌شناسی، مسیرها و بررسی نقش ژن‌های کانونی در خوشه

دو

در مطالعه حاضر بیان ژن گلوکان اندو-۶،۱-بتا-گلوکوزیداز (*Ta.21069.2.S1_a_at*) بتدریج پس از مایه‌زنی افزایش داشته و بیشترین افزایش مربوط به ۴ روز پس از مایه‌زنی است. بتا-۶،۱-گلوکان‌های قارچی اجزای ضروری دیواره سلولی قارچی هستند. این آنزیم‌ها می‌توانند دیواره سلولی قارچ را تخریب کنند، که برای فرآیندهایی مانند تشکیل ریشه، رشد کونیدیوم و رشد سایر ساختارهای قارچی بسیار مهم است. این تجزیه می‌تواند گلوکان‌های پیام‌دهنده تولید کند که به عنوان الگوهای مولکولی مرتبط با بیمارگر (PAMPs) عمل می‌کنند و در گندم، پروتئین‌های متصل‌شونده به کیتین به عنوان PRR عمل کرده و با اتصال به PAMPs، مسیرهای پیام‌رسانی دفاعی از جمله مسیر کینازهای فعال‌شده با میتوزن (MAPK) را فعال می‌کنند (Perrot et al., 2022). در این مطالعه مسیر پیام‌رسانی MAPK از مسیرهای معنی دار شناسایی شده در خوشه دو هم بود. با توجه به شواهد موجود به نظر می‌رسد این ژن کاندیدای مقاومت نوع ۱ در این پاتوسیستم باشد.

در مطالعه حاضر بیان ژن آرابینوگالاکتان (*Ta.30200.1.A1_at*) ۱ روز پس از مایه‌زنی بیشترین افزایش داشته است. پروتئین‌های آرابینوگالاکتان گلیکوپروتئین‌های سطح سلولی هستند که در بسیاری از جنبه‌های رشد گیاه، مانند تشکیل الگو، تعامل فیتوهورمون‌ها، تمایز بافت، تولید مثل، پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی، گسترش سلولی و رسوب دیواره سلولی ثانویه نقش دارند (Pereira et al., 2015). اما در مورد نقش آن در ایجاد مقاومت گندم به بلایت فوزاریومی خوشه اطلاعاتی تاکنون منتشر نشده است.

در مطالعه حاضر بیان ژن آنزیم فلاوانون ۳-دی‌اکسیژناز ۲-مانند (*Ta.7223.3.S1_x_at*) پس از مایه‌زنی بتدریج در حال افزایش بود و بیشترین افزایش مربوط به ۴ روز پس از مایه‌زنی است. آنزیم فلاوانون ۳-دی‌اکسیژناز در سنتز فلاونوئیدها نقش دارند که به عنوان فیتوالکسین‌های

ضدمیکروبی و الفاکندنده‌های مقاومت در برابر بیماری عمل می‌کنند و از گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا محافظت می‌کنند. این آنزیم در تولید فلاونون‌هایی مانند ساکورانتین نقش دارد که می‌تواند مقاومت گیاه را در برابر عوامل بیماری‌زای قارچی مانند *Fusarium fujikuroi* و *Magnaporthe oryzae* افزایش دهد (Wang et al., 2022). همچنین مشخص شده که این آنزیم در پاسخ دفاعی اولیه کاج سفید علیه بیماری زنگ تاولی کاج سفید (*Cronartium ribicola*) نقش دارد (Figueroa-Corona et al., 2024). افزایش آنزیم فلاوانون ۳-دی‌اکسیژناز و همچنین معنی‌دار شدن مسیر سنتز دی‌ترپنوئیدها (جدول ۲) در این مطالعه در خوشه ۲ به نظر می‌رسد نشان دهنده دفاع ثانویه باشد.

در مطالعه حاضر ژن پروتئین کیناز سرین/ترونین (*Ta.5450.1.A1_at*) ۴ روز پس از مایه‌زنی بیشترین افزایش بیان را داشت. افزایش بیان پروتئین کیناز سرین/ترونین در دو لاین مقاوم گندم (Wuhan 1 و HC374) ۴ روز پس از مایه‌زنی با قارچ مشاهده شده است. از طرف دیگر پروتئین سرین/ترونین کینازها در رقم حساس (Shaw) کمترین افزایش بیان را در ۲ روز پس از مایه‌زنی داشتند و مرتبط با حساسیت در نظر گرفته شده‌اند (Pan et al., 2018). پروتئین کیناز سرین/ترونین نقش‌های پیچیده‌ای در دفاع گیاه ایفا می‌کنند، برخی از آنها با فعال کردن مسیرهای پیام‌رسانی پایین‌دست یا افزایش بیان ژن‌های مرتبط با دفاع، به عنوان تنظیم‌کننده‌های مثبت پاسخ‌های دفاعی عمل می‌کنند، در حالی که برخی دیگر می‌توانند توسط عوامل بیماری‌زا هدف قرار گیرند تا آلودگی را افزایش دهند. درک نقش‌های خاص این کینازها و تعاملات آنها با عوامل بیماری‌زا برای ایجاد مقاومت پایدار در برابر بیماری‌ها در گندم بسیار مهم است (Mao et al., 2010).

در مطالعه حاضر ژن یوریدین نوکلوزیداز ۲ (*Ta.9580.1.S1_at*) ۴ روز پس از مایه‌زنی بیشترین افزایش بیان را داشت. نوکلوزیدازهای یوریدین گیاهی آنزیم‌هایی هستند که نوکلوزیدها را تجزیه می‌کنند، فرآیندی که برای

نظیر کیتینازها، گلوکوزیدازها، فروکتوکینازها، نوکلئوزیدازها و کینازهای سرین/ترئونین در سازوکارهای دفاعی ارقام مقاوم گندم در برابر این بیماری فراهم می‌آورند.

پیشنهادات

اگرچه این مطالعه با شناسایی ژن‌های کانونی، بینش ارزشمندی برای گندم مقاوم به بلایت فوزاریومی خوشه فراهم می‌کند، اما نقش عملکردی این ژن‌ها نیاز به تأیید آزمایشگاهی دارد. مطالعات آینده باید بر اعتبارسنجی بیان این ژن‌ها با روش‌های دقیق‌تر مانند RT-qPCR متمرکز شوند. علاوه بر این، بررسی عملکردی ژن‌ها از طریق روش‌هایی مانند خاموشی یا بیان بیش از حد در گیاهان مدل و ارزیابی فنوتیپ مقاومت به بیماری ضروری است. در نهایت، توسعه نشانگرهای مولکولی بر پایه این ژن‌ها می‌تواند به انتخاب به‌نژادی برای هر می‌سازای چندین ژن مقاومت و ایجاد ارقامی با مقاومت پایدار و گسترده کمک کند. با توجه به انواع مکانیسم‌های مقاومت در برابر بیماری بلایت فوزاریومی خوشه در گندم، راهبردهای اصلاحی باید بر تجمع ژن‌های مؤثر در مسیرهای دفاعی مستقل برای ایجاد یک سیستم دفاعی چندوجهی و کارآمد متمرکز شوند تا سطح کلی مقاومت افزایش یابد. با این حال، هدف نهایی باید دستیابی به توازن بین مقاومت بیماری و سایر ویژگی‌های مهم زراعی مانند عملکرد باشد. معمولاً بین مقاومت در برابر بلایت فوزاریومی خوشه و عملکرد گندم همبستگی منفی وجود دارد، اگرچه سازوکارهای مولکولی این رابطه به طور کامل شناخته نشده‌اند (Bashir et al., 2025). شناسایی و همسانه‌سازی ژن‌های مقاومت می‌تواند به توسعه ارقام برتر با مقاومت بالا و ویژگی‌های مطلوب کمک کند. با این حال، دستیابی به ایمنی کامل در برابر بلایت فوزاریومی خوشه همچنان یک چالش بزرگ است و با توجه به تغییرات آب‌وهوایی و جمعیت‌های قارچی، اصلاح برای مقاومت پایدار نیازمند تحقیقات مستمر است (Zhang et al., 2023).

دفاع گیاه بسیار مهم است زیرا مسیرهای تخریب نوکلئوتید و بازیابی را به هم متصل می‌کند، اگرچه نقش خاص آنها در ایمنی به طور کامل درک نشده و نیاز به تحقیقات بیشتر دارد. در حالی که برخی تحقیقات بر نقش یوریدین کیناز در دفاع گیاه و مقاومت در برابر بیمارگر تمرکز دارند (Witte & Herde, 2024). به عنوان مثال افزایش بیان ژن‌های مرتبط با این آنزیم در پاسخ دفاعی صنوبر علیه بیماری لکه سیاه صنوبر ناشی از بیمارگر *Marssonina brunnea* (Guo et al., 2025) و در انگور در پاسخ به بیماری آنتراکنوز ناشی از *Elsinoë ampelina* (Li et al., 2022) گزارش شده است. با این حال عملکردهای خاص یوریدین نوکلئوزیدازها در این زمینه و در مقاومت گندم به بلایت فوزاریومی خوشه همچنان موضوعی است که نیاز به بررسی بیشتر دارد.

در این پژوهش بیان ژن کد کننده فروکتوکیناز ۱ و ۲ (*TaAffx.131309.1.S1_x_at*) هم در خوشه یک و هم در خوشه دو در ابتدا بدون تغییر و ۴ روز پس از مایه‌زنی کاهش داشت. این کاهش بیان ممکن است نشان‌دهنده یک تغییر متابولیک عمدی باشد تا منابع انرژی را از رشد به سمت دفاع هدایت کند. به نظر می‌رسد که خوشه دو علاوه بر این که در مقاومت نوع ۱ دخیل است، پاسخ‌های دفاعی ثانویه و سیستمیک را فعال می‌نماید.

اعتبارسنجی نتایج

نتایج اعتبارسنجی که همسویی بیان هفت ژن کانونی را در یک مطالعه RNA-Seq مستقل (Pan et al., 2018) نشان می‌دهد، به طور محکمی از صحت یافته‌های تحقیق حاضر پشتیبانی می‌کند. این همخوانی که بین دو پلتفرم تکنولوژیک متفاوت (ریزآرایه و توالی‌یابی RNA) مشاهده شده، نه تنها قابلیت اطمینان تحلیل را تقویت می‌کند، بلکه اهمیت عملکردی این ژن‌های کلیدی در پاسخ به بیماری بلایت فوزاریومی خوشه را نیز برجسته می‌سازد. به طور خاص، این داده‌ها شواهد دیگری مبنی بر مشارکت احتمالی آنزیم‌هایی

نتیجه‌گیری

این مطالعه با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی پیشرفته، شبکه‌های مولکولی پاسخ گندم به بیماری بلایت فوزاریومی خوشه را مورد بررسی قرار داد. ابتدا با اعتبارسنجی موفقیت‌آمیز روش ComBat در حذف اثرات تکنیکی، داده‌های بیان ژن برای تحلیل‌های بعدی آماده شد. سپس، با به‌کارگیری معیارهای روش سیلوئت و آرنج، تعداد بهینه خوشه‌ها ($k=2$) برای ۸۵۰ ژن دارای اثر متقابل شرایط \times زمان تعیین گردید. تحلیل روندهای بیان، دو الگوی متمایز را آشکار کرد: خوشه یک (۴۴۸ ژن) و خوشه دو (۴۰۲ ژن). شناسایی و آنالیز ژن‌های کانونی در هر خوشه، سازوکارهای پیچیده و مکمل دفاع را نشان داد. ژن‌های کلیدی خوشه یک عمدتاً در تولید مستقیم عوامل ضد قارچی (مانند کیتینازها، گلوکانازها و مهارکننده‌های پروتئاز BBI) نقش دارند که مسئول جلوگیری از نفوذ اولیه و محدود کردن گسترش بیماری و خنثی‌سازی قارچ‌زهرها (مقاومت تیپ I، II و III) هستند. در مقابل، ژن‌های کانونی خوشه دو در فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی ثانویه و سیستمیک، از جمله سنتز فیتوالکسین‌ها (فلاوانون ۳-دی‌اکسیژناز و مسیر دی‌ترپنوئید) و پیام‌رسانی (پروتئین کینازها) مشارکت دارند. وجود تعداد قابل توجهی ژن با عملکرد ناشناخته

در میان ژن‌های کانونی، شکاف مهمی در دانش حاضر را نشان می‌دهد. در نهایت، این مطالعه بر این نکته تأکید دارد که مقاومت پایدار در برابر بیماری بلایت فوزاریومی خوشه نه از طریق یک مسیر خطی، بلکه از طریق همکاری پویا و شبکه‌ای بین این خوشه‌های مجزا اما مکمل به دست می‌آید و لزوم اعتبارسنجی عملکردی این ژن‌های منتخب و استفاده از آنها در برنامه‌های به‌نژادی برای هر می‌سازی چندین ژن و ایجاد ارقام مقاوم را نشان می‌دهد.

تعارض منافع

در انجام مطالعه حاضر، هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد.

موازن اخلاقی

در انجام این پژوهش تمامی موازن و اصول اخلاقی رعایت گردیده است.

تشکر و قدردانی

از تمامی کسانی که در طی مراحل این پژوهش یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

- Al-Hashimi, A., Aina, O., Daniel, A. I., Du Plessis, M., Keyster, M., & Klein, A. (2025). Critical review on characterization, management, and challenges of fusarium head blight disease in wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 102557. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2024.102557>
- Anand, A., Zhou, T., Trick, H. N., Gill, B. S., Bockus, W. W., & Muthukrishnan, S. (2003). Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. *Journal of Experimental Botany*, 54(384), 1101-1111. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg110>
- Bai, G., Plattner, R., Desjardins, A., Kolb, F., & McIntosh, R. A. (2001). Resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *Plant Breeding*, 120, 1-6. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2001.00562.x>
- Bashir, L., Budhlakoti, N., Pradhan, A. K., Sharma, D., Jain, A., Rehman, S. S., Kondal, V., Jacob, S. R., Bhardwaj, R., Gaikwad, K., & Mishra, D. C. (2025). Identification of quantitative trait nucleotides for grain quality in bread wheat under heat stress. *Scientific Reports*, 15(1), 6641. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-91199-2>
- Bertassello, L., Winters, P., & Müller, M. F. (2023). Access to global wheat reserves determines country-level vulnerability to conflict-induced Ukrainian wheat supply disruption. *Nature Food*, 4(8), 673-676. <https://doi.org/10.1038/s43016-023-00806-w>
- Figueroa-Corona, L., Baesen, K., Bhattarai, A., Kegley, A., Sniezko, R. A., Wegrzyn, J., & De La Torre, A. R. (2024). Transcriptional profiling of early defense response to white pine blister rust infection in *Pinus albicaulis* (Whitebark Pine). *Genes*, 15(5), 602. <https://doi.org/10.3390/genes15050602>

- Gong X., He, X., Zhang, Y., Li, L., Sun, Z., Bai, G., Singh, P.K., Li, T. (2020). Development of an evaluation system for *Fusarium* resistance in wheat grains and its application in assessment of the corresponding effects of *Fhb1*. *Plant Disease*, 104(8), 2210-2216. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-19-2584-RE>.
- Guo, C., Yin, T., Wu, H., Dai, X., Chen, Y., & Wei, S. (2025). Genomic selection with GWAS-identified QTL markers enhances prediction accuracy for quantitative traits in poplar (*Populus deltoides*). *Communications Biology*, 8(1), 1242. <https://doi.org/10.1038/s42003-025-08700-w>
- Hartigan, J. A., & Wong, M. A. (1979). Algorithm AS 136: A k-means clustering algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society*, 28(1), 100-108. <https://doi.org/10.2307/2346830>
- Juliana, P., Singh, R. P., Singh, P. K., Poland, J. A., Bergstrom, G. C., Huerta-Espino, J., & Sorrells, M. E. (2018). Genome-wide association mapping for resistance to leaf rust, stripe rust and tan spot in wheat reveals potential candidate genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 131(7), 1405-1422. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3086-6>
- Li, Z., Gao, L., Chang, P., Chen, Z., Zhang, X., Yin, W., Fan, Y., & Wang, X. (2022). The impact of *Elsinoë ampelina* infection on key metabolic properties in *Vitis vinifera* 'RedGlobe' Berries via Multiomics approaches. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 35(1), 15-27. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-21-0225-R>
- Long, X., Balczak, M., Gulden, S., Cao, W., Fedak, G., Wei, Y. M., Zheng, Y. L., Somers, D., & Ouellet, T. (2015). Expression profiling identifies differentially expressed genes associated with the fusarium head blight resistance QTL 2DL from the wheat variety Wuhan-1. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 90, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2015.02.002>
- Ma, H., Liu, Y., Zhang, S., Sha, J., Sun, Y., Hu, Z., & Ma, H. (2025). Wheat resistance to *Fusarium* head blight and breeding strategies. *Crop Health*, 3(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s44297-025-00048-1>
- Ma, Z., Xie, Q., Li, G., Jia, H., Zhou, J., Kong, Z., Li, N., & Yuan, Y. (2020). Germplasms, genetics and genomics for better control of disastrous wheat *Fusarium* head blight. *Theoretical and Applied Genetics*, 133, 1541-1568. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03525-8>
- Mahajan, G., Sharma, N., Kaur, M., & Gupta, R. (2025). Chitinases: Key players in plant defense mechanisms against fungal pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 102664. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2025.102664>
- Mao, X., Zhang, H., Tian, S., Chang, X., & Jing, R. (2010). TaSnRK2.4, an SNF1-type serine/threonine protein kinase of wheat (*Triticum aestivum* L.), confers enhanced multistress tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 61(3), 683-696. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp331>
- Mendes, G. d. R. L., Pazdiora, P. C., Viana, V. E., Dallagnol, L. J., Calgaro, L. C., da Silva, G. J., Del Ponte, E. M., & Oliveira, A. C. d. (2025). Comparative Enzymatic and Gene Expression Responses in Wheat to DON- and NIV-Producing *Fusarium* Species. *Biology*, 14(8), 1063. <https://doi.org/10.3390/biology14081063>
- Michlmayr, H., Siller, M., Kenjeric, L., Doppler, M., Malachova, A., Hofer, M., Hametner, C., Schweiger, W., Steiner, B., Kugler, K. G., & Mayer, K. F. (2025). Detoxification of deoxynivalenol by pathogen-inducible tau-class glutathione transferases from wheat. *Journal of biological chemistry*, 110600. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2025.110600>
- Mohammadzadeh-Heydari, N., Tohidfar, M., Maleki Zanjani, B., Mohsenpour, M., Ghanbari Moheb Seraj, R., & Esmaeilzadeh-Salestani, K. (2024). Co-overexpression of chitinase and β -1,3-glucanase significantly enhanced the resistance of Iranian wheat cultivars to *Fusarium*. *BMC Biotechnology*, 24(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12896-024-00859-0>
- Pan, Y., Liu, Z., Rocheleau, H., Fauteux, F., Wang, Y., McCartney, C., & Ouellet, T. (2018). Transcriptome dynamics associated with resistance and susceptibility against fusarium head blight in four wheat genotypes. *BMC Genomics*, 19(1), 642. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5012-3>
- Pereira, A. M., Pereira, L. G., & Coimbra, S. (2015). Arabinogalactan proteins: rising attention from plant biologists. *Plant Reproduction*, 28(1), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s00497-015-0254-6>
- Perrot, T., Pauly, M., & Ramírez, V. (2022). Emerging roles of β -glucanases in plant development and adaptive responses. *Plants*, 11(9), 1119. <https://doi.org/10.3390/plants11091119>
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D. I., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Rousseeuw, P. J. (1987). Silhouettes: a graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 20, 53-65. [https://doi.org/10.1016/0377-0427\(87\)90125-7](https://doi.org/10.1016/0377-0427(87)90125-7)
- Sari, E., Cabral, A. L., Polley, B., Tan, Y., Hsueh, E., Konkin, D. J., Knox, R. E., Ruan, Y., & Fobert, P. R. (2019). Weighted gene co-expression network analysis unveils gene networks associated with the *Fusarium* head blight resistance in tetraploid wheat. *BMC Genomics*, 20(1), 925. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6161-8>
- Sirangelo, T. M. (2024). Molecular investigations to improve *Fusarium* head blight resistance in wheat: An update focusing on multi-omics approaches. *Plants*, 13(16), 2179. <https://doi.org/10.3390/plants13162179>
- Stuart, J. M., Segal, E., Koller, D., & Kim, S. K. (2003). A gene-coexpression network for global discovery of conserved genetic modules. *Science*, 302(5643), 249-255. <https://doi.org/10.1126/science.1087447>
- Wang, L., Chen, M., Lam, P. Y., Dini-Andreote, F., Dai, L., & Wei, Z. (2022). Multifaceted roles of flavonoids mediating plant-microbe interactions. *Microbiome*, 10(1), 233. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01420-x>
- Witte, C. P., & Herde, M. (2024). Nucleotides and nucleotide derivatives as signal molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 75(22), 6918-6938. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae377>
- Xie, Y., Ravet, K., & Pearce, S. (2021). Extensive structural variation in the Bowman-Birk inhibitor family in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Genomics*, 22(1), 218. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07475-8>
- Xu, M., Wang, Q., Wang, G., Zhang, X., Liu, H., & Jiang, C. (2022). Combatting *Fusarium* head blight: advances in molecular interactions between *Fusarium graminearum* and wheat. *Phytopathology Research*, 4, 37. <https://doi.org/10.1186/s42483-022-00142-0>

- Zhang, H., Liu, Y., Zhang, X., Ji, W., & Kang, Z. (2023). A necessary considering factor for breeding: growth-defense tradeoff in plants. *Stress Biology*, 3(1), 6. <https://doi.org/10.1007/s44154-023-00086-1>
- Zhang, J., Yang, W., Yue, J., Liu, Y., Pei, D., & Wang, H. (2020). The responses of wheat autophagy and ATG8 family genes to biotic and abiotic stresses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(2), 867-876. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-10027-w>
- Zhang, X., Jia, L., Zhang, Y., Jiang, G., Li, X., Zhang, D., & Tang, W. (2012). In planta stage specific fungal gene profiling elucidates the molecular strategies of *Fusarium graminearum* growing inside wheat coleoptiles. *Plant Cell*, 24, 5159-5176. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.105957>
- Zhang, Y., Parmigiani, G., & Johnson, W. E. (2020). ComBat-seq: batch effect adjustment for RNA-seq count data. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 2(3), lqaa078. <https://doi.org/10.1093/nargab/lqaa078>