

Identification and Expression Analysis of RLP and RLK Gene Family Members in Transcriptome of Saffron Infected with *Fusarium Oxysporum* Corm Rot

Fatemeh Hatami¹, Farhad Nazarian-Firouzabadi^{2,*}, Seyed Sajad Sohrabi³ and Mitra Khademi³

1-Former M.Sc. Student, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

2- Professor, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

3- Assistant Professor, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

*Corresponding author ✉: nazarian.f@lu.ac.ir

Citation: Hatami, F., Nazarian-Firouzabadi, F., Sohrabi, S.S. and Khademi, M. (2023). Identification and Expression Analysis of RLP and RLK Gene Family Members in Transcriptome of Saffron Infected with *Fusarium Oxysporum* corm rot. *Plant Genetic Researches*, 11(1): 121-136. <http://dx.doi.org/10.22034/PGR.11.1.8>

(Received: July 17, 2024; Final Revised: August 24, 2024; Accepted: September 8, 2024; Published online: September 21, 2024)

Extended abstract

Introduction

Saffron (*Crocus sativus* L.) is not only one of the most expensive food products in Iran and globally but also holds a special place among Iran's export commodities and industrial goods. Since saffron is propagated only through corms, preventing corms from fungal infections and other devastating pathogens is crucial to maintaining corms quality and increasing the saffron yield. Hence, investigating the genetic mechanisms associated with the response of the saffron plant to fungal pathogens such as fusarium corm rot (*Fusarium oxysporum*) is of great importance. Given that plants express a wide range of resistance genes to respond to pathogens, studying the role of genes associated with the Pattern-Triggered Immunity (PTI) pathway, such as LysM-RLKs genes, is crucial. To this end, studying the transcriptome of saffron corms infected with the pathogen *Fusarium oxysporum* may help identify genes belonging to the RLP and RLK gene families. In the present study, the transcriptome of saffron corms infected with the *Fusarium oxysporum* was analyzed to identify genes within PTI pathway. This study aimed to analyze the expression of key genes exhibiting differential expression, as identified through RNA-seq analysis, using real-time RT-qPCR.

Material and methods

In this study, transcriptome sequencing data were analyzed to examine the gene expression profiles across various saffron tissues, including the pistil, leaf, petal, stamen, stigma, apical and lateral buds, as well as corms infected with *Fusarium oxysporum*. Next, following quality control of the raw sequence data, reads were processed using CLC Genomics Workbench software with default parameters. This involved trimming to remove adapter sequences, filtering out low-quality reads, and eliminating low-quality base pairs from the reads. To identify the members of the RLK and RLK gene families, first, the nucleotide sequences of such genes from *Arabidopsis thaliana* were retrieved and used to BLAST+ local transcriptomic data. Recovered BLAST hits were manually



©2024 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

examined and checked by the Pfam database to ensure the family membership of identified genes. Plus, CDD database was also used to find conserved domains. The expression values of genes were calculated on the Transcripts Per Million scale in different tissues and differential expression analysis was performed. Finally, cluster analysis and heat map graphs were generated to group the genes for different treatments. Following visual and expert evaluations of infected saffron corms with *Fusarium oxysporum*, RNA was extracted from *Fusarium*-infected and control corms. Quantitative analysis of total RNA was conducted by measuring optical density at 260/280 nm using a Nanodrop Ultraviolet Spectrophotometer. RNA integrity was evaluated by electrophoresis on 1% (w/v) agarose gel and visualization under UV light. Additionally, two genes from the RLP and RLK families were selected to validate transcript RNA-seq differentially expressed genes using qRT-PCR.

Result and discussion

A total of 45 genes encoding PTI pathway receptors were identified in the saffron transcriptome, with 40 and 5 sequences belonging to the RLPs and RLKs families, respectively. Also, the highest (15 motifs) and the lowest (2 motifs) number of conserved motifs was found in contig_58591 and seven different contigs, respectively. The heat map generated from the in silico expression profiling of differentially expressed genes (DEGs) demonstrated that the identified genes were categorized into two distinct groups. Contig 41583 and contig 61879 were clustered together in one group, while the remaining sequences were distributed across different groups. The expression analysis of main RLPs and RLKs genes showed that contig 41583 from RLK and contig 61879 from RLK families exhibited the highest expression in the saffron stigma and corms, respectively. Furthermore, the expression of the selected genes in the infected corms significantly increased compared to that of the control healthy corms. Additionally, qRT-PCR analysis involving genes encoded by contig 41583 and contig 61879 indicated that a higher expression in corms was found after 72 hours post-infection. Overall, the results of the present study suggest that RLK proteins play a crucial role in response to fungal infections, particularly due to the presence of the LysM motifs.

Conclusion

Since LysM motif binds to chitin oligomers of fungal cell walls of certain fungi and oomycetes, it triggers plant immune responses. The findings of this study imply that RLPs and RLKs expression analysis provide important insights into the specific nature of the plant-pathogen interaction and offer a deeper understanding of the PTI pathway.

Keywords: Innate immunity, Chitin, *Fusarium*, Pattern-Triggered Immunity



شناسایی و بررسی بیان ژن‌های خانواده‌های ژنی RLP و RLK در ترنسکریپتوم پیاز زعفران آلوده به بیماری پوسیدگی فوزاریومی

فاطمه حاتمی^۱، فرهاد نظریان فیروزآباد^{۲*}، سید سجاد سهرابی^۳ و میترا خادمی^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۲- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۳- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۲۷؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱۴۰۳/۰۶/۰۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۱۸؛ تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۳/۰۶/۳۱)

چکیده

زعفران (*Crocus sativus* L.) نه تنها یکی از ارزشمندترین محصولات کشاورزی ایران و جهان به‌شمار می‌آید، بلکه جایگاه ویژه‌ای در بین محصولات صادراتی و صنعتی ایران دارد. تکثیر این گیاه از طریق بیه صورت می‌گیرد از این رو، جلوگیری از آلودگی بنه‌های زعفران با بیمارگرها، چالشی مهم برای حفظ کیفیت و عملکرد محصول زعفران است. بنابراین، بررسی سازوکارهای ژنتیکی مربوط به واکنش گیاه زعفران به بیمارگرهای قارچی از جمله عامل پوسیدگی فوزاریومی بنه زعفران (*Fusarium oxysporum*)، بسیار حائز اهمیت است. با توجه به اینکه گیاهان برای دفاع از خود طیف وسیعی از ژن‌های مقاومت را بیان می‌کنند و در این بین، نقش ژن‌های مربوط به مسیر PTI (Pattern-Triggered Immunity: PTI) همانند ژن‌های خانواده LysM-RLK در مقاومت به بیمارگرها بسیار مهم است؛ از این رو در این مطالعه ترنسکریپتوم بنه‌های زعفران آلوده به بیمارگر *Fusarium oxysporum* به منظور شناسایی و بررسی ژن‌های متعلق به خانواده‌های ژنی RLP و RLK، مورد مطالعه قرار گرفت. در مجموع، ۴۵ ژن کدکننده گیرنده‌های (Receptors) مسیر PTI در ترنسکریپتوم زعفران شناسایی شدند که از این تعداد ۴۰ توالی متعلق به خانواده RLP (Receptor-like proteins) و ۵ توالی متعلق به خانواده RLK (Receptor-like kinases) بودند. بررسی بیان اعضای این خانواده‌های ژنی نشان داد که بیشترین بیان به ترتیب مربوط به توالی‌های Contig-41583 (RLP) و Contig-61879 (RLK) در بافت‌های کلاله و پیاز زعفران بود. همچنین افزایش بیان معنی‌داری این ژن‌ها در نمونه‌های آلوده نسبت به نمونه شاهد مشخص شد. علاوه بر این، نتایج سنجش بیان ژن‌های انتخاب شده (Contig-41583 و Contig-61879) با استفاده از روش qRT-PCR نشان داد که ژن‌های مورد بررسی در تیمار ۷۲ ساعت پس از آلودگی نسبت به تیمار ۴۸ ساعت بیان بالاتری داشته‌اند. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که پروتئین‌های RLK به دلیل وجود موتیف LysM عملکردی حیاتی در تعامل بین زعفران و بیمارگر دارد. اتصال موتیف LysM به پپتیدوگلیکان‌های باکتریایی یا کیتین‌های دیواره برخی قارچ‌ها و اوومیسیت‌ها سبب تحریک پاسخ‌های ایمنی گیاه می‌شود. به طور کلی، یافته‌های این مطالعه در درک ماهیت اختصاصی روابط بین بیمارگر و گیاه حائز اهمیت بوده و می‌تواند در شناخت مسیر ایمنی PTI مفید باشد.

واژگان کلیدی: ایمنی ذاتی، کیتین، فوزاریوم، مسیر ایمنی PTI

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus L.*) گیاهی چندساله، متعلق به خانواده زنبقیان (*Iridaceae*) و یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی ایران و جهان است (Golmohammadi, 2014; Sohrobi et al., 2020). ارزش دارویی بسیار بالای این گیاه به دلیل وجود متابولیت‌های ثانویه ارزشمندی همچون کروسین، پیکروکروسین و سافرانال است که از آن‌ها در صنایع غذایی و دارویی به وفور استفاده می‌شود (Frusciante et al., 2014; Mentis et al., 2021). با وجود ارزش اقتصادی و دارویی بالای این گیاه، سطح زیرکشت زعفران به دلیل افزایش رخداد تنش‌های متعدد زیستی و غیرزیستی در سال‌های اخیر کاهش چشمگیری داشته است (Frusciante et al., 2014; Mentis et al., 2021).

بیمارگرهای باکتریایی و قارچی از عوامل تأثیرگذار بر رشد، عملکرد و میزان تولید محصول زعفران می‌باشند. در میان بیمارگرهای مختلف، پوسیدگی بنه زعفران حاصل از بیمارگر *Fusarium oxysporum* عامل اصلی محدودیت تولید زعفران گزارش شده است (Gupta et al., 2021) که نه تنها باعث کاهش عملکرد این گیاه در واحد سطح می‌شود، بلکه تولید بنه‌های نسل بعد زعفران را به عنوان بنه بذری تحت تأثیر قرار می‌دهد (Bhagat et al., 2022a; Lu and Tsuda, 2021; Mansotra et al., 2023).

بیمارگر *Fusarium oxysporum* یک قارچ انگلی است که با گیاهان میزبان برهمکنش دارد و یکی از عوامل بیماری‌های موسوم به بیماری‌های پوسیدگی فوزاریومی در بنه زعفران است (Joshi, 2018; Steinkellner et al., 2008; Thrane, 1990; Williams, 1996). این قارچ‌ها برای به دست آوردن مواد مغذی مورد نیاز خود، به گیاهان میزبان وابسته هستند؛ از این رو، مکانیسم‌های مولکولی را توسعه داده‌اند که به آن‌ها امکان ورود به گیاهان را می‌دهد (Taghikhani et al., 2018). به دلیل توانایی ماندگاری طولانی مدت این قارچ به حالت خفته در خاک، وجود میزبان چندساله و طیف وسیع میزبان، کنترل این عامل بیمارگر در کشت زعفران دشوار است (Joshi, 2018). سیستم مدیریت بیماری قارچی غالباً در درجه اول، مبتنی

بر استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی و در وهله بعد به بهنژادی گونه‌های مقاوم به بیماری متکی است. با این حال، استفاده مداوم از قارچ‌کش‌های شیمیایی به‌طور فزاینده‌ای محیط زیست را تهدید کرده و مقاومت به قارچ‌کش‌ها را در بیمارگرهای گیاهی افزایش داده است (Fan et al., 2017)؛ بنابراین، شناخت و استفاده بهینه‌تر از ظرفیت ژنتیکی گیاهان مقاوم در برنامه‌های بهنژادی با هدف مقابله با انواع مختلف بیمارگرهای گیاهی به‌ویژه بیمارگرهای قارچی مورد توجه قرار گرفته است.

گیاهان به‌عنوان موجوداتی ساکن در طی تکامل راه‌کارهای مولکولی پیچیده‌ای را برای ایجاد ایمنی و همچنین انتقال پیام از محل آلودگی به هسته سلول و به دنبال آن همه‌پیکر خود توسعه داده‌اند و از این طریق بقای خود را در مواجهه با انواع بیمارگرهای گیاهی تضمین نموده‌اند (Abedi et al., 2021; Nürnberger and Kemmerling, 2006). تشخیص حمله بیمارگرها توسط گیرنده‌های مولکولی موجود در غشای پلاسمایی سلول‌های گیاهی، از جمله راهکارهای مقابله با بیمارگرهای مهاجم است (Fallahzadeh, 2018). این گیرنده‌ها، در واقع پروتئین‌هایی هستند که مولکول‌های ویژه‌ای از میکروب‌ها را شناسایی کرده و پس از آن پیام‌های داخلی سلولی را تولید و واکنش‌های دفاعی را شروع می‌کنند (Fallahzadeh, 2018). به‌طور کلی، گیرنده‌های ایمنی گیاهان را می‌توان به دو گروه شامل گیرنده‌های متصل شونده به نوکلئوتیدی حاوی تکرارهای غنی از لوسین (Nucleotide binding leucine-rich repeat receptors: NLRs) و یا گیرنده‌های شناسایی الگو (Pattern recognition receptors: PRRs) طبقه‌بندی کرد. بر این اساس، گیرنده‌های NLR و PRR به‌عنوان آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت به بیماری (Resistance gene analogs: RGAs) شناخته می‌شوند. گیرنده‌های گروه PRR به‌عنوان خط اصلی دفاع در برابر بیمارگرها محسوب می‌شوند که به دو گروه گیرنده‌های شبه پروتئینی RLPs (Receptor-like proteins) و یا شبه کاینازی RLKs (Receptor-like kinases) طبقه‌بندی می‌شوند (Antolín-Lovera et al., 2012; Lu and Tsuda, 2012).

واکنش گیاه زعفران به بیمارگرهای قارچی از جمله بیمارگرهای فوزاریومی بسیار مهم است. از آنجایی که نقش خانواده ژنی LysM-RLK در القاء مقاومت در گیاه زعفران ناشناخته است؛ از این رو در این مطالعه ترنسکریپتوم پیاز زعفران آلوده به بیمارگر فوزاریوم مورد بررسی قرار گرفت تا نقش اعضای خانواده ژنی LysM-RLK در مقابله با بیمارگر *Fusarium oxysporum* مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و پردازش داده‌های ترنسکریپتومی: در این مطالعه از داده‌های حاصل از توالی‌یابی ترنسکریپتوم بنه زعفران آلوده به *Fusarium oxysporum* حاصل از دو آزمایش باگات و همکاران (Bhagat et al., 2022a) و درویشیان و همکاران (Darvishian et al., 2022) استفاده شد. علاوه بر این، به منظور بررسی دقیق‌تر تغییرات بیان ژن‌های شناسایی شده، داده‌های ترنسکریپتومی بافت‌های مختلف زعفران شامل بنه، برگ، گل‌برگ، پرچم و کلاله، جوانه اپیکال، جانبی و انتهایی از پایگاه NCBI دریافت و مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور بررسی کیفیت خوانش‌های کوتاه خام از نرم‌افزار FastQC (نسخه ۰.۱۱.۶) استفاده شد. برای انجام فرآیند تریمینگ شامل حذف توالی آداپتور باقی‌مانده در توالی‌های موجود، توالی‌های با کیفیت پایین (با میانگین Phred score کمتر از ۳۰)، توالی‌های با میزان بالای نوکلئوتیدهای خوانش نشده (N) و توالی‌های با اندازه کمتر از ۱۰۰ جفت‌باز از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench (نسخه ۲۰) استفاده شد. سرهم‌بندی (اسمبلی) خوانش‌های تمیز شده (clean reads) با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench بر اساس پارامترهای پیش‌فرض انجام شد.

شناسایی اعضاء خانواده‌ی ژنی RLK: به منظور شناسایی اعضای خانواده‌های ژنی RLK ابتدا توالی پروتئینی و نوکلئوتیدی مرتبط با مهمترین ژن‌های شناخته شده اعضای این خانواده در گیاه *Arabidopsis* بازیابی شدند. پس از هم‌ترازی و به دست آوردن توالی مورد توافق برای توالی‌های دریافت شده، از tBLASTn علیه پروفایل بیانی بنه زعفران جهت

گیرنده‌های شبه کایناز RLKs یک خانواده بزرگ پروتئینی در گیاهان هستند که ۶۱۰ عضو در *Arabidopsis* و ۱۱۰۰ عضو در برنج دارند (Shiu et al., 2004). این گیرنده‌ها شامل یک دامین کایناز داخل سلولی، یک دامین گذرنده از غشاء و همچنین یک دامین خارج سلولی متصل شونده به لیگاند هستند که در انتقال پیام دخالت دارند، در حالی که RLPs فاقد دامین داخل سلولی هستند (Li et al., 2014). دامین خارج سلولی الگوهای مولکولی مرتبط با بیمارگر (PAMP-Triggered Immunity-Pti: PAMP) را تشخیص می‌دهند و به محض اتصال مولکول‌های خاص به RLPs/RLKs پاسخ‌های سریعی مانند تولید انواع اکسیژن فعال (Reactive oxygen species: ROS) و به دنبال آن فعال‌سازی کاینازی‌های فعال شونده به واسطه‌ی میتوزن (Mitogen-activated protein kinase: MAPK) برای مقابله با حمله و گسترش بیمارگر صورت می‌گیرد (Meng and Zhang, 2013; Qiu et al., 2015).

از مهمترین مولکول‌های مرتبط با بیمارگر می‌توان به کیتین، لیپوپلی‌ساکارید (Lipopolysaccharides: LPS)، فلاژلین، گلوکان، پپتیدوگلیکان و ارگوسترول‌ها موجود در دیواره‌ی سلولی بیمارگرها اشاره نمود (Nürnberg and Kemmerling, 2006; Zipfel, 2014). گیرنده‌های کاینازی در گیاهان دارای دامین‌های با وظایف مشخص است که بسته به نوع RLKs/RLKs، تعداد دامین موجود، توالی دامین‌ها، طول و گاهی محل قرارگیری آن‌ها نسبت به یکدیگر متفاوت است. تعداد اندکی از RLKها همچون گیرنده شبیه کاینازی، حاوی موتیف لیزین (Lysin Motif) در ساختمان خود هستند که در اتصال به مولکول کیتین آزاد شده از دیواره بیمارگرها نقش دارد (Li et al., 2021).

با توجه به جایگاه مهم زعفران در اقتصاد ایران و رقابت شدید بین تعدادی از کشورهای تولیدکننده این محصول در بازارهای جهانی، شناسایی و بررسی عوامل تاثیرگذار بر عملکرد کمی و کیفی این محصول ارزشمند در مناطق عمده‌ی کشت زعفران حائز اهمیت است (Khaledi, 2020)؛ بنابراین شناسایی و بررسی ژن‌های درگیر در

مایه‌زنی قارچ فوزاریوم به بنه‌های زعفران: از جدایه قارچ *Fusarium oxysprum f. sp. Gladioli* با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر برای مایه‌زنی بنه‌ها استفاده شد. به منظور اعمال تیمار، ابتدا با استفاده از نوک سوزن استریل، منافذی برای تلقیح سوسپانسیون قارچ ایجاد و سپس مقدار ۵ میکرولیتر از محلول سوسپانسیون قارچ توسط سرنگ به بنه‌ها تزریق شد. شایان ذکر است در نمونه‌های شاهد از آب مقطر استریل استفاده شد. بنه‌های گروه تیمار و شاهد در سه تکرار جداگانه در ظروف شیشه‌ای قرار داده شدند و سپس در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در زمان‌های ۰، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار نمونه‌برداری انجام شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA: جهت بررسی بیان برخی از ژن‌های خانواده‌های ژنی RLP و RLK از بنه‌های زعفران آلوده شده و بنه‌های شاهد (عاری از آلودگی قارچی)، استخراج RNA و سپس سنتز cDNA صورت گرفت. برای استخراج RNA از محلول ترایزول (شرکت NEB به شماره T2010S) و مطابق شیوه‌نامه شرکت سازنده استفاده شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل (یک درصد) الکتروفورز RNA و اسپکتوفوتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر مورد بررسی گرفت. به منظور حذف آلودگی احتمالی DNA ژنومی موجود در نمونه‌ها از آنزیم *DNaseI* استفاده شد. جهت سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA شرکت سینا کلون مطابق با شیوه‌نامه شرکت سازنده استفاده شد.

طراحی آغازگرها: ابتدا توالی ناحیه کدکننده ژن‌های انتخاب شده از فایل سرهم‌گذاری شده ترنسکرپتوم استخراج و سپس به منظور طراحی آغازگرها برای تکثیر بخشی از ژن‌های مذکور از نرم‌افزار AlleleID (نسخه ۶) استفاده شد. مشخصات آغازگرهای طراحی شده در جدول ۱ نشان داده شده است.

شناسایی توالی‌های متعلق به این خانواده در زعفران استفاده شد. همچنین در ادامه از الگوریتم MEME 5.0.5 برای یافتن دمین‌های حفظ شده و برای اطمینان بیشتر از صحت توالی‌های شناسایی شده از پایگاه CDD نیز استفاده شد. با استفاده از پایگاه برخط TMHMM وضعیت قرار گرفتن موتیف اتصال به لیگاند خارج سلولی نسبت به غشاء بررسی شد. علاوه بر این توالی پروتئینی ژن‌های شناسایی شده بر اساس تجزیه و تحلیل موتیف Pfam بررسی و مورد طبقه‌بندی قرار گرفتند. در نهایت، توالی‌های پروتئینی و نوکلئوتیدی شناسایی شده با استفاده از الگوریتم CLUSTAL W هم‌ردیف شدند.

بررسی بیان اعضاء خانواده‌های ژنی RLP و RLK: پس از نقشه‌یابی خوانش‌های تمیز شده علیه مرجع ترنسکرپتومی ساخته شده، مقادیر بیان ژن‌های شناسایی شده در مقیاس TPM (Transcripts Per Million) در بافت‌های مختلف محاسبه شد. پس از کمی‌سازی بیان ژن‌ها، توالی‌های با مقادیر \log_2FC بزرگ‌تر یا مساوی $|\pm 1|$ و FDR کوچک‌تر از ۰/۰۵ به‌عنوان ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs) شناسایی شدند. در نهایت به منظور گروه‌بندی ژن‌ها در تیمارهای مورد مطالعه، از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای به‌همراه ترسیم نقشه حرارتی مبتنی بر مقادیر $\log(TPM+1)$ استفاده شد.

تهیه و ضدعفونی بنه‌های زعفران: بنه‌های زعفران (*Crocus sativus L.*) از مزارع کشت زعفران در مشهد تهیه و سپس ضدعفونی شدند. بدین منظور ابتدا بنه‌ها به مدت یک دقیقه در محلول اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و سپس سه مرتبه با آب مقطر سترون، شستشو شدند و پس از آن بنه‌ها در محلول هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر شستشو داده شدند.

جدول ۱ - نام، توالی و دمای اتصال آغازگرهای مورد استفاده در واکنش qRT-PCR

Table 1. Name, sequence and annealing temperature of primers used in qRT-PCR reactions

آغازگر	توالی آغازگر (3' → 5')	دمای اتصال (°C)	طول قطعه تکثیری
Primer	Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Amplicon size
<i>RLKs</i>	F: CATTATGTCGTCCTTCCAA R: AACTCCAGAGGCTATGAA	56.3	118 bp
<i>RLPs</i>	F: ATCAAGCGGTTCTACAAG R: CAGTATCCGACCAGAGTA	57.9	104 bp
<i>elf1-a</i>	F: TGAACCATCCAGGACAGATTG R: TCTTAACCATAACCAGCATCACC	57	171 bp

نتایج و بحث

سره‌م‌بندی نوپدید ترنسکرپتوم زعفران: سره‌م‌بندی پروفایل بیانی زعفران با استفاده از ادغام خوانش‌های تریم شده با استفاده از نرم افزار CLC Genomics Workbench منجر به ایجاد ۶۳۳۲۶ توالی منحصر به فرد شد (جدول ۲). همچنین حجم کل پروفایل بیانی زعفران ۶۴/۶۵ Mb محاسبه گردید.

نتایج بلاست اسمبلی ساخته شده علیه پایگاه NR نشان داد که ۳۵۳۹۴ (۵۵/۸۹ درصد) رونوشت با حد آستانه $E\text{-value} \leq 1.0$ ، دارای رکورد مشابه در پایگاه NR بودند. همچنین نتایج بلاست اسمبلی در مطالعه حاضر نشان داد که زعفران بیشترین شباهت را با گیاه مارچوبه (*Asparagus officinalis*) و پس از آن با نخل (*Phoenix dactylifera*) دارد (شکل ۱).

شناسایی اعضای خانواده‌های ژنی RLP و RLK: نتایج مطالعه حاضر منجر به شناسایی ۴۰ توالی کدکننده RLP و ۵ توالی کدکننده RLK در پروفایل بیانی زعفران شد. بیشترین تعداد دمین (۱۵ دمین) مربوط به توالی با شناسه contig_58591 بود و کمترین تعداد دمین (۲ دمین) در چندین توالی مشاهده شد (جدول ۳ و ۴). تمامی توالی‌های کدکننده‌ی RLK دارای موتیف لیزین (LysM-RLK) اتصال به لیگاند خارج سلولی بودند در حالی که همه توالی‌های کدکننده RLPs موتیف اتصال به لیگاند خارج سلولی نداشتند.

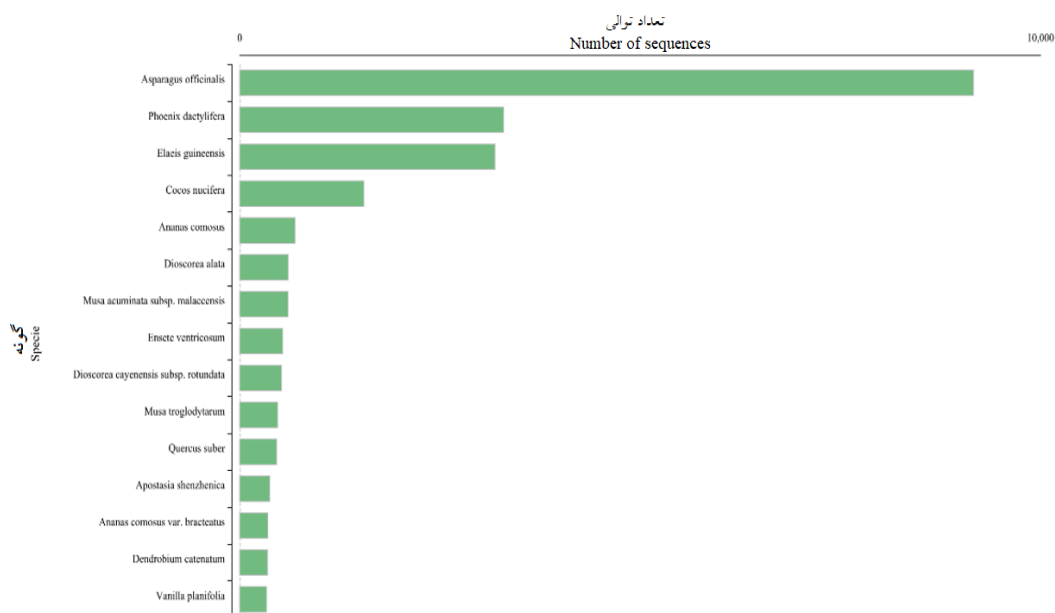
بررسی الگوی بیان ژن‌های منتخب با روش qRT-PCR:

برای بررسی بیان ژن‌های منتخب، از روش qRT-PCR استفاده شد. برای انجام این واکنش از کیت SinaSYBR Blue IIS-qPCR Mix, 2x شرکت سیناکلون استفاده شد. ترکیب و مقادیر مورد نیاز جهت انجام واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر (2x) Master Mix، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت و برگشت، ۸ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز و ۲/۵ میکرولیتر cDNA بود و واکنش‌ها در دستگاه Rotor-Gene Q شرکت Qiagen انجام گرفت. برنامه حرارتی جهت تکثیر ژن‌ها شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه؛ ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال آغازگرها به الگو به مدت ۲۰ ثانیه (دمای این مرحله از چرخه بسته به ترکیب آغازگر بر اساس جدول ۱ و برای هر جفت آغازگر متغیر بود) و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. در این آزمایش ژن کنترل داخلی *elf1-α* جهت نرمال‌سازی مقادیر بیان ژن‌ها استفاده شد (Livak and Schmittgen, 2001). این آزمایش در سه تکرار زیستی و دو تکرار فنی انجام گردید. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم افزار LinRegPCR و Microsoft Excel (نسخه ۲۰۲۰) انجام شد.

جدول ۲- خلاصه‌ای از کمیت و کیفیت داده‌های خوانش شده مرجع ترنسکرپتومی زعفران

Table 2. A summary of the quantity and quality of read data of saffron transcriptome reference

پارامترها Parameters	ارزش Value
تعداد رونوشت Number of transcripts	63326
اندازه کوتاه‌ترین نوشت (نوکلئوتید) Size of the smallest transcript (nt)	200
اندازه بلندترین نوشت (نوکلئوتید) Size of the largest transcript (nt)	16256
تعداد نوکلئوتید Number of bases	64651404
میانگین طول رونوشت‌ها (نوکلئوتید) Mean length of the transcripts (nt)	1020.93
تعداد رونوشت‌های با طول بیشتر از ۱۰ کیلو باز Number of transcripts greater than 1kb	23146
تعداد رونوشت‌های شامل قاب خوانش باز Number of transcripts with ORF	22388
N90	482
N70	935
N50	1413
N30	2100
N10	3571
محتوای GC (درصد) GC (%)	43.36



شکل ۱- توزیع فراوانی گونه‌های گیاهی با همولوژی بالا با ترنسکرپتوم بنه زعفران

Figure 1. Frequency distribution of species with high homology to saffron corm transcriptome

جدول ۳- توالی‌های RLP شناسایی شده در ترنسکرپتوم بنه زعفران

Table 3. RLP sequences identified in the saffron corm transcriptome

نام	شناسه	نوع	تعداد موتیف‌ها	ارزش E	تعداد اسیدآمینه‌ها	تعداد دمین غشایی
Name	ID	Type	No. of motifs	Value E	No. of amino acids	No. of the membrane domain
CsRLP1	contig_40963	RLP	5	5.78E-61	539	1
CsRLP2	contig_35098	RLP	6	1.96E-60	360	0
CsRLP3	contig_44279	RLP	5	2.27E-57	595	2
CsRLP4	contig_11034	RLP	2	3.01E-56	410	0
CsRLP5	contig_2435	RLP	3	5.05E-53	309	0
CsRLP6	contig_59494	RLP	4	1.04E-45	455	2
CsRLP7	contig_45995	RLP	6	6.94E-39	755	1
CsRLP8	contig_10774	RLP	6	8.73E-39	394	0
CsRLP9	contig_18234	RLP	6	2.11E-35	540	0
CsRLP10	contig_58963	RLP	6	2.78E-35	593	1
CsRLP11	contig_15305	RLP	2	5.23E-33	424	0
CsRLP12	contig_41583	RLP	3	1.23E-56	182	0
CsRLP13	contig_15305	RLP	2	4.70E-43	424	0
CsRLP14	contig_19084	RLP	2	2.05E-40	246	0
CsRLP15	contig_27718	RLP	3	1.65E-39	655	3
CsRLP16	contig_53132	RLP	5	2.50E-39	369	0
CsRLP17	contig_2020	RLP	5	3.25E-39	791	2
CsRLP18	contig_9727	RLP	3	7.17E-39	295	0
CsRLP29	contig_19524	RLP	2	1.27E-60	409	0
CsRLP20	contig_53712	RLP	3	5.18E-57	394	0
CsRLP21	contig_20691	RLP	3	1.23E-57	416	0
CsRLP22	contig_36392	RLP	5	9.14E-59	319	0
CsRLP23	contig_61125	RLP	2	4.40E-11	194	0
CsRLP24	contig_9819	RLP	4	9.43E-59	461	0
CsRLP25	contig_33077	RLP	2	5.74E-30	307	0
CsRLP26	contig_64283	RLP	8	3.65E-29	847	1
CsRLP27	contig_20408	RLP	5	9.13E-29	427	1
CsRLP28	contig_18033	RLP	4	7.34E-56	393	1
CsRLP39	contig_64168	RLP	4	4.90E-55	386	0
CsRLP30	contig_42453	RLP	4	7.60E-55	456	1
CsRLP31	contig_2664	RLP	8	4.09E-51	537	2
CsRLP32	contig_58591	RLP	15	1.59E-54	570	1
CsRLP33	contig_43722	RLP	5	1.65E-47	673	2
CsRLP34	contig_14217	RLP	4	2.84E-47	401	0
CsRLP35	contig_40478	RLP	8	5.61E-47	718	1
CsRLP36	contig_19408	RLP	2	8.56E-46	299	0
CsRLP37	contig_63302	RLP	4	1.58E-45	207	0
CsRLP38	contig_40963	RLP	5	1.91E-69	539	1
CsRLP49	contig_58064	RLP	4	1.31E-38	311	0
CsRLP40	contig_44981	RLP	6	2.48E-28	691	1

جدول ۴- توالی‌های پروتئینی RLK شناسایی شده در ترنسکریپتوم بانه گیاه زعفران

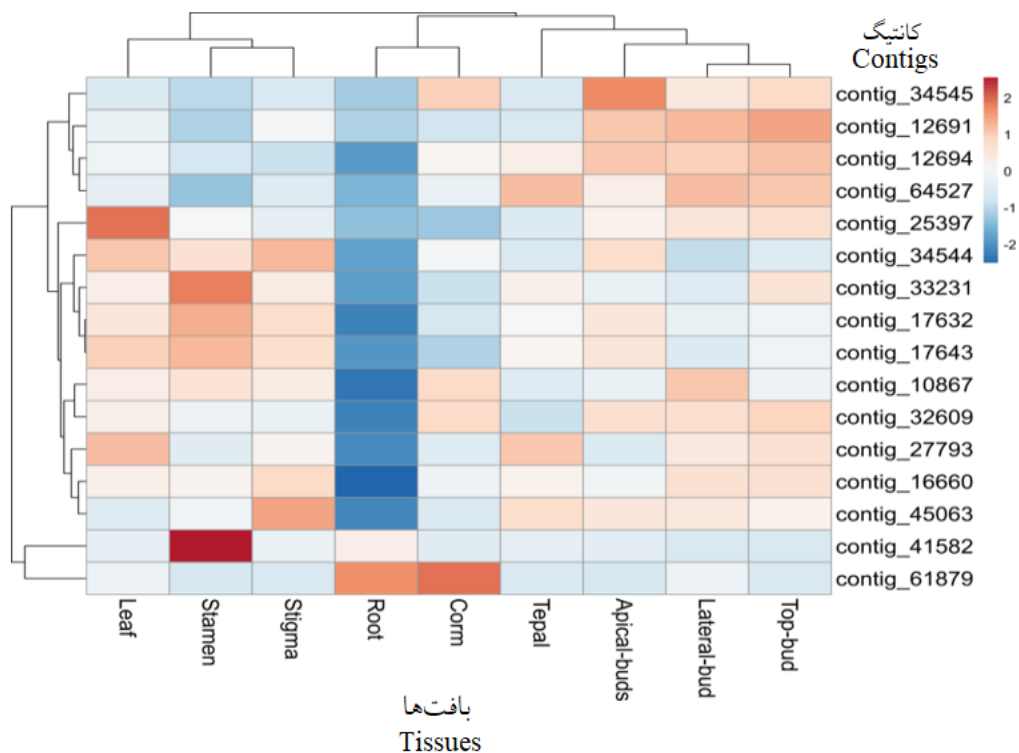
Table 4. RLK protein sequences identified in the saffron corm transcriptome

شناسه ID	نوع Type	تعداد موتیف No. of domains	ارزش E E Value	تعداد اسید آمینه‌ها No. of amino acids	تعداد اسید آمینه دمین LysM No. of amino acids with LysM domain
contig_34545	RLK	5	6.95E-86	581	37
contig_34544	RLK	5	1.74E-85	571	37
contig_61879	RLK	3	2.06E-62	623	47
contig_32609	RLK	4	1.67E-57	624	26
contig_64527	RLK	4	2.60E-64	447	26

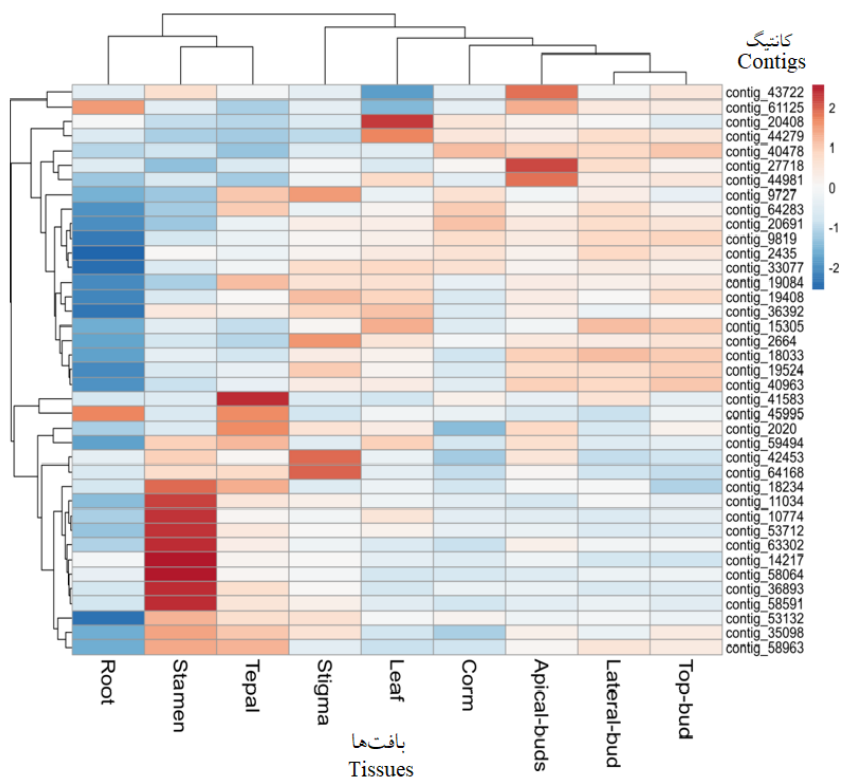
داد که بافت‌های بررسی شده در دو گروه مجزا قرار گرفتند، به طوری که بیشترین و کمترین بیان ژن‌های RLP به ترتیب در بافت کلاله و ریشه بود (شکل ۲).

نتایج گروه‌بندی بر اساس میزان بیان ژن‌های RLP شناسایی شده در زعفران با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (Principal component analysis: PCA) نشان داد که بافت ریشه در گروهی کاملاً مجزا از سایر بافت‌ها قرار می‌گیرد که این نتیجه مطابق با تحلیل خوشه‌ای می‌باشد. همچنین نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز نشان داد که بافت‌های مربوط به جوانه، دارای بیان همسانی از نظر ژن‌های شناسایی شده هستند و در یک خوشه قرار می‌گیرند (شکل ۴ الف). همچنین تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی برای ژن‌های RLK نشان داد که مؤلفه اصلی ۱ (PC1) و مؤلفه اصلی ۲ (PC2) در مجموع بیش از ۷۰ درصد تغییرات بیان در بافت‌های مختلف را توجیه می‌کند. پلات حاصل از تجزیه و تحلیل PCA نشان داد که بافت ریشه در گروه جداگانه از سایر بافت‌ها قرار گرفت که تأییدی بر خوشه‌بندی Heat map بود (شکل ۴ ب). همچنین نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی همین ژن نشان داد که بافت‌های مربوط به برگ، پرچم و کلاله دارای بیان همسانی از نظر بیان ژن‌های شناسایی شده بودند.

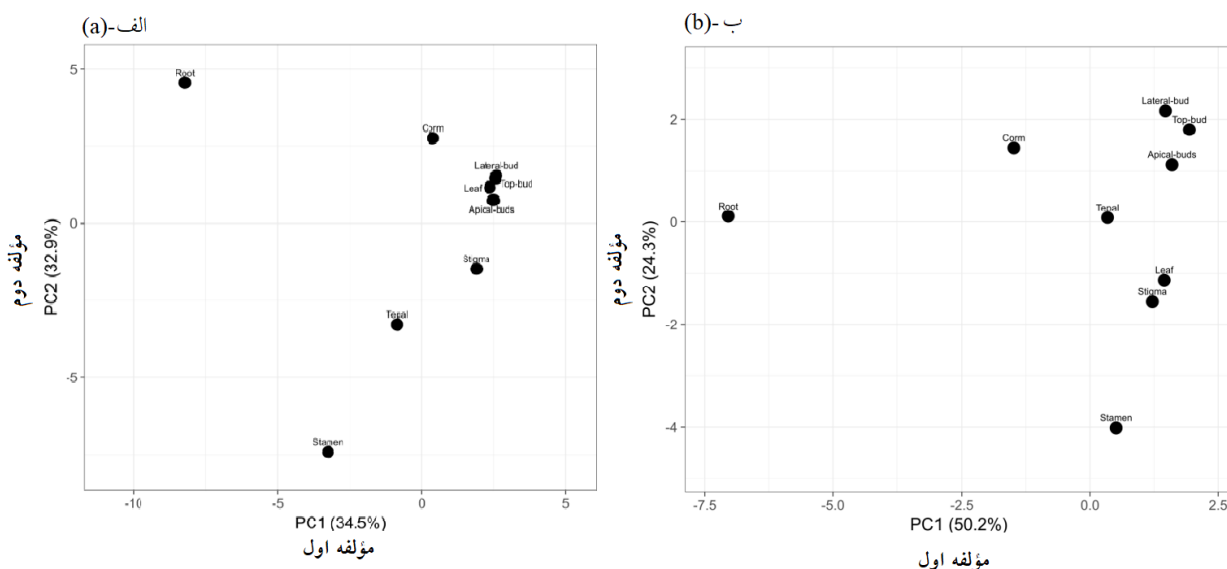
بررسی بیان *In silico* خانواده‌های ژنی RLP و RLK در بافت‌های مختلف گیاه زعفران: نتایج بررسی بیان ژن‌های خانواده‌های ژنی RLP و RLK شناسایی شده در مطالعه حاضر، در قالب نقشه حرارتی ارائه شد است (شکل‌های ۲ و ۳). نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که ژن‌های شناسایی شده از نظر بیان در دو گروه مجزا قرار می‌گیرند، به طوری که توالی‌های Contig-61879 و Contig-41583 در یک گروه و بقیه توالی‌ها در گروه دیگری قرار گرفته‌اند. بیشترین بیان در بین توالی‌های شناسایی شده به ترتیب مربوط به توالی‌های Contig-61879 و Contig-41583 بود. علاوه بر این، نتایج این مطالعه نشان داد که توالی‌ها از نظر بیان در بافت‌های مختلف، در دو گروه مجزا قرار گرفته‌اند به طوری که در گروه اول بافت‌های برگ، پرچم و کلاله و در گروه دوم بقیه بافت‌ها قرار دارند. بیان بافت‌های گروه اول نسبت به گروه دوم بیشتر بود (شکل ۳). نتایج بررسی بیان ژن‌های RLP نیز نشان داد که ژن‌های شناسایی شده از نظر بیان در چهار گروه مجزا قرار گرفتند. بیشترین بیان در بین توالی‌های شناسایی شده به ترتیب مربوط به توالی‌های Contig-20408، Contig-41583، Contig-14217 و Contig-58064 بود. علاوه بر این، نتایج این مطالعه نشان



شکل ۲- الگوی بیان ژن‌های RLK در بافت‌های مختلف گیاه زعفران. خانه‌های رنگی براساس راهنمای نقشه میزان بیان را نشان می‌دهند.
Figure 2. The expression patterns of RLK genes in various tissues of the saffron plant are illustrated. The colored boxes represent the expression levels according to the provided map guide.



شکل ۳- الگوی بیان ژن‌های RLP در بافت‌های مختلف گیاه زعفران، مستطیل‌های رنگی براساس راهنمای نقشه میزان بیان را نشان می‌دهند.
Figure 3. The expression patterns of RLP genes in various tissues of the saffron plant are shown. The colored boxes indicate the expression levels based on the map guide.



شکل ۴- تجزیه به مؤلفه های اصلی مبتنی بر برای بیان ژن‌های (الف) RLP و (ب) RLP در ترنسکرپتوم بافت‌های مختلف زعفران
 Figure 4. Principal component analysis (PCA) for the expression levels of (a) RLP and (b) RLK genes in saffron transcriptome identified in different tissues

بیان ژن‌های کلیدی در برخورد با انواع تنش و محرک‌های حاصل از آن‌ها، به‌نظر می‌رسد که دست‌یابی به اطلاعات دقیق‌تر و کامل‌تر ژنومی و ترنسکرپتومی ضروری باشد (Darvishian *et al.*, 2022). به‌همین منظور، مطالعه پروفایل بیانی بنه‌های زعفران آلوده به بیمارگر فوزاریوم جهت شناسایی ژن‌های درگیر در پاسخ به این بیمارگر فارچی حائز اهمیت است. لیو و همکاران (Luo *et al.*, 2023) پروفایل بیانی بنه‌های زعفران آلوده به قارچ فوزاریوم در سه و شش روز بعد از آلودگی را مطالعه کردند. نتایج این مطالعه منجر به شناسایی تعداد ۸۴۵۴۴ یونی ژن و مستندسازی ۳۹۹۶۲ ژن گردید که از این میان تعداد ۱۴۲۶۳ ژن در روز سوم و تعداد ۱۶۳۹۷ ژن در روز ششم پس از آلودگی، بیان افتراقی داشتند (Luo *et al.*, 2023). همچنین نتایج بررسی ترنسکرپتوم زعفران بعد از آلودگی نشان داد که بنه زعفران پس از آلودگی مسیر بیوستنز متابولیک فنیل پروپانویید را فعال کرده و باعث تقویت دیواره سلولی و سنتز متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند فنل‌ها و فلاونوئیدها شد که در نتیجه آن رشد قارچ مهار گردید (Luo *et al.*, 2023). در همین راستا و در مطالعه دیگری، درویشیان و همکاران (Darvishian *et al.*, 2022) به بررسی ژن‌های مختلف در فرآیند پاسخ بنه زعفران به آلودگی *F. oxysporum* در تیمار

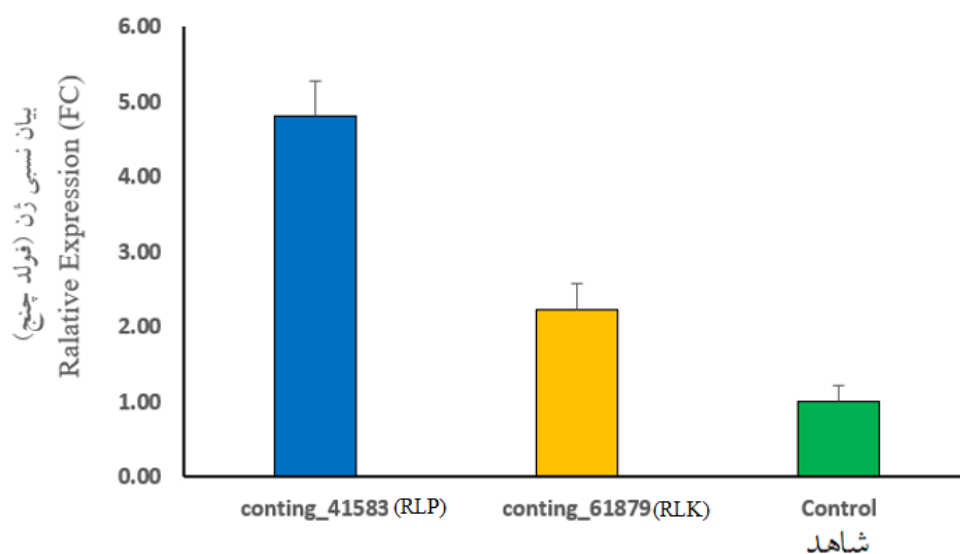
تجزیه و تحلیل تغییرات بیان ژن‌های کاندید با استفاده از qRT-PCR: براساس نمودار آتش‌فشانی، بیشترین میزان بیان به‌ترتیب مربوط به توالی با شناسه contig_61879 و contig_41583 بود؛ بنابراین جهت تأیید نتایج حاصل، دو ژن کاندید مورد نظر از هر یک از خانواده‌های RLP و RLK با روش qRT-PCR بررسی شدند. تغییرات بیان ژن‌های RLP و RLK در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح با قارچ *Fusarium oxysporium* نسبت به شاهد در شکل‌های ۵ و ۶ ارائه شده است. بررسی تغییرات بیان ژن‌های RLP و RLK پس از ۴۸ ساعت از اعمال مایه‌زنی نشان داد که ژن‌های RLP نسبت به ژن‌های RLK بیان بیشتری داشته‌اند (شکل ۵).

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن‌های RLP و RLK در تیمار ۷۲ ساعت نیز نشان داد که میزان بیان ژن در RLP بیشتر از RLK بود (شکل ۶). داده‌های حاصل از بررسی بیان در دو تیمار ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که به‌طور کلی در تیمار ۷۲ ساعت میزان بیان ژن‌ها نسبت به تیمار ۴۸ ساعت بیشتر بود.

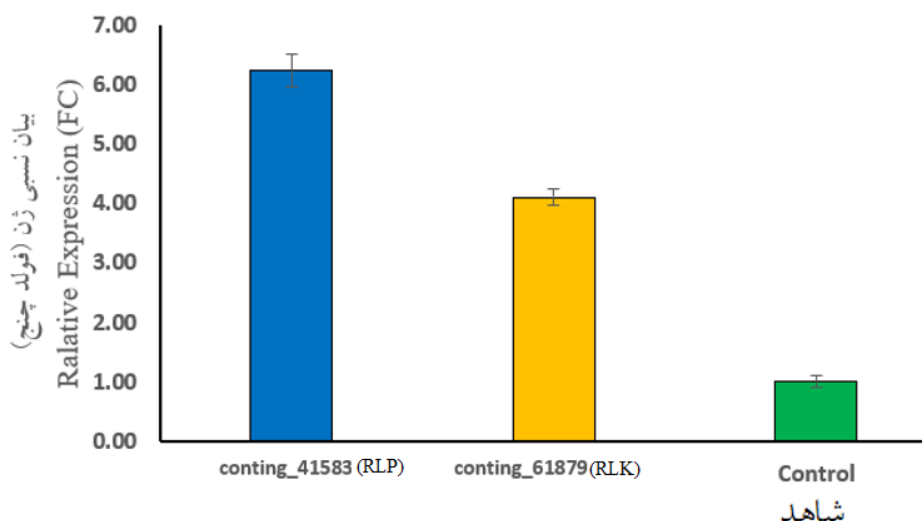
پوسیدگی بنه حاصل از آلودگی قارچ *F. oxysporum f.sp. gladioli* یکی از مخرب‌ترین بیماری‌ها در کشت زعفران است (Najari *et al.*, 2018). با توجه به اهمیت این گیاه و لزوم بررسی دقیق مکانیسم‌های دفاعی و ارزیابی تغییرات

(*et al.*, 2022). همچنین با توجه به فقدان توالی‌های ژنی ثبت شده در پایگاه داده NCBI برای گیاه زعفران، مستندسازی و تعیین گروه‌های کارکردی رونوشت‌ها، جهت تولید محتوا و افزایش اطلاعات ژنتیکی این گیاه ارزشمند خواهد بود که با داده‌های حاصل از این مطالعه و مطالعات پیشین لیو و همکاران (*Luo et al.*, 2023) و درویشیان و همکاران (*Darvishian et al.*, 2022) می‌توان به این امر مهم دست یافت.

۷۲ و ۴۸ ساعت بعد از مایه‌زنی با قارچ پرداختند. نتایج حاصل از داده‌های RNA-seq این مطالعه نشان داد که از میان ۳۸۶۴۳ توالی مستندسازی شده، تعداد ۲۲۰۹ توالی دارای بیان افتراقی بودند که از این میان ۱۸۳۲ توالی کاهش و ۳۳۷ توالی افزایش بیان نشان دادند (*Darvishian et al.*, 2022). با توجه به نتایج مطالعه حاضر، پروفایل بیانی ایجاد شده از نظر حجم و تعداد رونوشت مطابقت بالایی با دیگر پروفایل‌های بیانی گزارش شده زعفران دارد (*Darvishian*).



شکل ۵- بیان نسبی ژن‌های RLP و RLK مربوط به بنه زعفران ۴۸ ساعت پس از تلقیح با *Fusarium oxysporum*
 Figure 5. Relative expression of RLP and RLK genes in saffron corms 48 hours post-inoculation with *Fusarium oxysporum*



شکل ۶- بیان نسبی ژن‌های RLP و RLK مربوط به بنه زعفران ۷۲ ساعت پس از تلقیح با *Fusarium oxysporum*
 Figure 6. Relative expression of RLP and RLK genes in saffron corms 72 hours post-inoculation with *Fusarium oxysporum*

بیشترین بیان مربوط به گیرنده کیناز BAK1 مشاهده شده که یک گیرنده مهم برای تشخیص الگوی مورد نیاز برای ایمنی القا شده با PTI است (Bhagat et al., 2022b).

مطالعه حاضر منجر به شناسایی ۱۶ ژن دارای موتیف LysM در ترنسکریپتوم زعفران شد که در مقایسه با ژنوم گیاهان دیگر مانند، *S. G. max*, *O. sativa*, *A. thaliana*, *B. rapa*, *B. nigra*, *B. juncea*, *tuberosum* و *Brachypodium* به ترتیب با ۵، ۶، ۱۲، ۹، ۹، ۵، ۳ و ۱ ژن بیشتر بود (Luo et al., 2023; Morkunas et al., 2005; Yang et al., 2020). همچنین در مطالعه‌ای دیگری که توسط نظریان فیروزآبادی و همکاران (Nazarian-Firouzabadi et al., 2019) صورت گرفت، تعداد ۷۷ پروتئین RLK در سیب‌زمینی شناسایی شد که در میان آن‌ها ۱۰ پروتئین LysM-RLK وجود داشت. تعداد مشابهی از پروتئین‌های LysM-RLK نیز در ژنوم *Medicago truncatula* (۱۷ پروتئین)، سویا (۱۲ پروتئین) و گوجه‌فرنگی (۱۴ پروتئین) شناسایی شدند (Nazarian-Firouzabadi et al., 2019). از دلایل احتمالی بیشتر بودن تعداد ژن‌های دارای موتیف LysM در زعفران، می‌توان به تنوع تعداد ژن‌ها و رویدادهای تکراری ژن اشاره نمود (Abedi et al., 2021). این موضوع نشان می‌دهد که تکرار ژن به‌طور قابل‌توجهی به گسترش خانواده‌های RLK و RLP کمک می‌کند (Yang et al., 2020).

به‌طور کلی، یک گیرنده‌ی LysM-RLKs در گیاهان از تعدادی دمین با وظایف مشخص تشکیل شده است. بسته به نوع عملکرد LysM-RLKs، تعداد و نوع این دمین‌ها، توالی آن‌ها و گاهی محل قرارگیری آن‌ها نسبت به یکدیگر متفاوت است (Nazarian-Firouzabadi et al., 2019). با این حال، در گیاه زعفران هر LysM-RLKs از یک دمین خارج سلولی مسئول اتصال به لیگاند در سر N، یک دمین گذرنده از غشا و یک دمین کاتالیتیکی (کاینازی) در انتهای C در درون سلول تشکیل شده است (Li et al., 2014). پروتئین‌های LysM-RLK به نام‌های CsLysM1، CsLysM2، CsLysM3، CsLysM4 و CsLysM5 در

تحلیل ترنسکریپتوم بنه زعفران در پژوهش حاضر، شواهدی از فعال شدن مسیره‌های PTI و تحریک و راه‌اندازی سیستم ایمنی گیاه در پاسخ به بیمارگر قارچی نشان داد. در جریان حمله بیمارگرها، مهمترین مرحله در فعال‌سازی دفاع گیاهی، شناخت موفقیت‌آمیز عامل بیماری‌زا است. گیرنده‌های شبه‌کینازی دارای موتیف لیزین (LysM) در شناسایی شروع استقرار بیمارگر در گیاه میزبان نقش مهمی دارند (Miya et al., 2007; Yang et al., 2020). این گیرنده‌ها سبب فعال شدن آبخاری از پروتئین‌ها در گیاه میزبان شده و در نهایت سبب افزایش مقاومت به بیمارگرها می‌شوند؛ بنابراین با وجود اهمیت اقتصادی زعفران مطالعه گیرنده‌های گروه PRR به ویژه گیرنده‌های شبه کینازی دارای موتیف لیزین LysM-RLK در زمان هجوم بیمارگر در بنه‌ها می‌تواند اطلاعات با ارزشی به منظور پیشبرد اهداف به‌نژادی زعفران به‌دست آورد. در مطالعه‌ای، عابدی و همکاران (Abedi et al., 2021) نتایج مطالعه عابدی و همکاران (Abedi et al., 2021) نشان داد که ۳۳ ژن LysM-RLK در بین گونه‌های برسیکا وجود دارد که از این بین حضور ۱۷ ژن در *B. napus* و تنها ۸ ژن در هر یک از گونه‌های *B. oleracea* و *B. rapa* تأیید شد. همچنین نتایج مطالعه مذکور و دیگر مطالعات مشابه که در آن‌ها به بررسی تعداد ژن‌های RLK و RLP در گونه‌های گیاهی پرداخته شده بود نشان داد که فراوانی ژن‌های LRR-RLK در مقایسه با LysM-RLK بیشتر بود (Abedi et al., 2021; Li et al., 2021; Lu and Tsuda, 2020; Yang et al., 2020; Tirnaz et al., 2020). همچنین در مطالعه‌ای توسط باگات و همکاران (Bhagat et al., 2022) به بررسی تعداد ژن‌های LRR-RLK در بنه زعفران آلوده به قارچ فورازیوم پرداخته شد. نتایج حاصل از این مطالعه حضور کلاس‌های مختلف LRR-RLKs همچون گیرنده‌های پروتئین‌های کیناز اختصاصی سرین/ترتوینین (STPK)، انواع مختلف گیرنده LRR شبه کینازی براسینو استروئید (BRL2) و گیرنده تکرارهای غنی از لوسین را تأیید نمود (Bhagat et al., 2022b). در میان این گیرنده‌ها

در جریان آلودگی با قارچ‌های کیتین‌دار افزایش می‌یابد (Miya *et al.*, 2007). در مطالعه حاضر نیز بیان ژن‌های RLP نسبت به LysM-RLK بیشتر بود. به این ترتیب که با افزایش مدت زمان آلودگی بنه‌ها از ۴۸ ساعت به ۷۲ ساعت پس از تلقیح بیان این ژن‌ها نیز بیشتر شد، به طوری که در تیمار ۷۲ ساعت بیشترین بیان ژن‌های RLP و LysM-RLK مشاهده شد و در مقایسه با شاهد به ترتیب ۲/۶۴ و ۲/۰۴ (Log₂FC) افزایش یافت.

در مطالعه درویشیان و همکاران (Darvishian *et al.*, 2022) که در آن به بررسی بیان ده ژن مهم در مسیر دفاعی گیاه با استفاده از روش Real-time PCR پرداختند، مشخص شد که میزان بیان در ژن‌های کیتیناز، سرین/ترونین کیناز و عامل رونویسی WRKY افزایش و میزان بیان نسبی پکتین استراز و NADPH کوینون اکسیدوردوکتاز و HSP کاهش یافت. با مقایسه‌ی نتایج مطالعه حاضر با مطالعه درویشیان و همکاران (Darvishian *et al.*, 2022) و سایر منابع ذکر شده، می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش زمان از شروع تلقیح بنه‌های زعفران به *F. oxysporum* تا روز سوم، فعال شدن مسیره‌های متابولیک‌های ثانویه مثل فنل‌ها و فلاونوئیدها، مسیره‌های انتقال پیام هورمونی، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، واکنش فوق‌حساسیت و بیان ژن‌های دخیل در مقاومت PTI افزایش می‌یابد (Luo *et al.*, 2023; Morkunas *et al.*, 2013; Sattler and Funnell-Harris, 2005).

به طور کلی، در این مطالعه، مکانیسم تعامل بین *C. sativus* و *F. oxysporum* را مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت که منجر به شناسایی اعضاء خانواده RLP و LysM-RLK در زعفران شد. همچنین نتایج نشان داد که تنظیم بیان ژن‌های خانواده RLP و RLK در بافت‌های مختلف زعفران متفاوت است. امید می‌رود یافته‌های پژوهش حاضر گام مؤثری در شناسایی مکانیسم مقاومت این گیاه به بیمارگرها باشد.

References

Abedi, A., Hajiahmadi, Z., Kordrostami, M., Esmaeel, Q. and Jacquard, C. (2021). Analyses of lysin-motif receptor-like kinase (lysm-rlk) gene family in allotetraploid brassica napus l. and its progenitor species: an in silico study. *Cells*, **11**: 37.

پروفایل بیانی زعفران شناسایی شدند. این توالی‌ها به طور میانگین دارای ۳ تا ۵ دمین LysM بودند که طول تقریبی آن‌ها حدود ۴۷-۲۶ اسیدآمینو بود. دمین‌های LysM دارای یک ساختار ثانویه بسیار حفاظت شده هستند که تقریباً حاوی ۵۰ اسیدآمینو است که به کیتین و پپتیدوگلیکان‌ها بیمارگر متصل می‌شوند و واکنش‌های دفاعی گیاه را فعال می‌کند (Abedi *et al.*, 2021; Cui *et al.*, 2015). ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2007) با مطالعه موتیف‌های LysM در گیاهان مختلف نشان دادند که حداقل ۱۱ نوع مختلف از این موتیف در گیاهان وجود دارد که شش نوع از این موتیف‌ها مربوط به پروتئین‌های LysM کیناز و پنج نوع دیگر در پروتئین‌های غیرکیناز LysM است (Zhang *et al.*, 2007). همچنین لیپانن و همکاران (Leppyanen *et al.*, 2021) نشان دادند که علاوه بر پاسخ ایمنی گیاه، ژن‌های LysM-RLK در تعامل گیاه و قارچ آربوسکولار میکوریز (AM) نیز نقش دارند (Leppyanen *et al.*, 2021). با توجه به نتایج مطالعه حاضر و مطالعات پیشین، می‌توان به نقش حیاتی پروتئین‌های LysM-RLK در تعامل گیاه و میکروب پی برد (Tombuloglu *et al.*, 2019).

در این مطالعه با توجه به اینکه بیمارگر فوزاریوم همیبیوتروف بود و دوره بیوتروف آن که فاقد علائم می‌باشد، ممکن است چند روز طول بکشد، روند تغییرات بیان این ژن‌ها در بازه‌های زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه روند بیان ژن LysM-RLK در بافت‌های مختلف زعفران نشان دهنده تفاوت بیان در بافت‌های مختلف بود که بیشترین میزان بیان این ژن در بافت پرچم و کمترین میزان بیان در بافت جوانه مشاهده شد.

در مطالعه حاضر، بیان نسبی ژن‌های RLP و RLK شناسایی شده با استفاده از واکنش‌های Real-time RT-PCR. اختلاف معنی‌داری نشان داد. همان‌طور که در تحقیقات پیشین نیز گزارش شده بود، بیان گیرنده‌های LysM-RLK

- Antolín-Lovera, M., Ried, M.K., Binder, A. and Parniske, M.** (2012). Receptor kinase signaling pathways in plant-microbe interactions. *Annual Review of Phytopathology*, **50**: 451-473.
- Bhagat, N., Magotra, S., Gupta, R., Sharma, S., Verma, S., Verma, P.K., Ali, T., Shree, A. and Vakhlu, J.** (2022a). Invasion and colonization of pathogenic *Fusarium oxysporum* R1 in *Crocus sativus* L. during corm rot disease progression. *Journal of Fungi*, **8**: 1246.
- Bhagat, N., Mansotra, R. and Patel, K.** (2022b). Saffron-*Fusarium oxysporum* R1 dual transcriptomics unravels, defense mechanism of saffron and robust pathogenicity of *Fusarium oxysporum* R1.
- Cui, H., Tsuda, K. and Parker, J.E.** (2015). Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annual Review of Plant Biology*, **66**: 487-511.
- Darvishian, A., Nazarian-Firouzabadi, F., Darvishnia, M. and Ismaili, A.** (2022). Identification of microsatellite molecular markers in saffron (*Crocus sativus* L.) using RNA-Seq data. *Saffron Agronomy and Technology*, **10(2)**: 149-161 (In Persian).
- Fallahzadeh, V.** (2018). Innate immunity in plants. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, **6**: 343-361 (In Persian).
- Fan, F., Hamada, M., Li, N., Li, G. and Luo, C.** (2017). Multiple fungicide resistance in *Botrytis cinerea* from greenhouse strawberries in Hubei Province, China. *Plant Disease*, **101**: 601-606.
- Frusciante, S., Diretto, G., Bruno, M., Ferrante, P., Pietrella, M., Prado-Cabrero, A., Rubio-Moraga, A., Beyer, P., Gomez-Gomez, L. and Al-Babili, S.** (2014). Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**: 12246-12251.
- Golmohammadi, F.** (2014). Saffron and its farming, economic importance, export, medicinal characteristics and various uses in South Khorasan Province-East of Iran. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, **3**: 566-596.
- Gupta, V., Sharma, A., Rai, P.K., Gupta, S.K., Singh, B., Sharma, S.K., Singh, S.K., Hussain, R., Razdan, V.K. and Kumar, D.** (2021). Corm rot of saffron: Epidemiology and management. *Agronomy*, **11**: 339.
- Joshi, R.** (2018). A review of *Fusarium oxysporum* on its plant interaction and industrial use. *Journal of Medicinal Plants Studies*, **6**: 112-115.
- Khaledi, N.** (2020). Evaluation of cell wall degrading enzymes of *Fusarium* species associated with root and corm of saffron in South Khorasan province. *Saffron Agronomy & Technology* **8**: 16 (In Persian).
- Leppyanen, I.V., Pavlova, O.A., Vashurina, M.A., Bovin, A.D., Dolgikh, A.V., Shtark, O.Y., Sendersky, I.V., Dolgikh, V.V., Tikhonovich, I.A. and Dolgikh, E.A.** (2021). LysM receptor-like kinase lyk9 of *Pisum Sativum* L. may regulate plant responses to chitoooligosaccharides differing in structure. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**: 711.
- Li, L., Li, M., Yu, L., Zhou, Z., Liang, X., Liu, Z., Cai, G., Gao, L., Zhang, X. and Wang, Y.** (2014). The FLS2-associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity. *Cell Host & Microbe*, **15**: 329-338.
- Li, Q., Qi, J., Qin, X., Hu, A., Fu, Y., Chen, S. and He, Y.** (2021). Systematic identification of lysin-motif receptor-like kinases (LYKs) in *Citrus sinensis*, and analysis of their inducible involvements in citrus bacterial canker and phytohormone signaling. *Scientia Horticulturae*, **276**: 109755.
- Lu, Y. and Tsuda, K.** (2021). Intimate association of PRR-and NLR-mediated signaling in plant immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **34**: 3-14.
- Luo, J., Zhang, A., Tan, K., Yang, S., Ma, X., Bai, X., Hou, Y. and Bai, J.** (2023). Study on the interaction mechanism between *Crocus sativus* and *Fusarium oxysporum* based on dual RNA-seq. *Plant Cell Reports*, **42**: 91-106.
- Mansotra, R., Ali, T., Bhagat, N. and Vakhlu, J.** (2023). Injury and not the pathogen is the primary cause of corm rot in *Crocus sativus* (saffron). *Frontiers in Plant Science*, **14**: 1074185.
- Meng, X. and Zhang, S.** (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology*, **51**: 245-266.
- Mentis, A.F.A., Dalamaga, M., Lu, C. and Polissiou, M.G.** (2021). Saffron for “toning down” COVID-19-related cytokine storm: Hype or hope? A mini-review of current evidence. *Metabolism Open*, **11**: 100111.

- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H. and Shibuya, N.** (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**: 19613-19618.
- Morkunas, I., Marczak, L., Stachowiak, J. and Stobiecki, M.** (2005). Sucrose-induced lupine defense against *Fusarium oxysporum*: Sucrose-stimulated accumulation of isoflavonoids as a defense response of lupine to *Fusarium oxysporum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **43**: 363-373.
- Nazarian-Firouzabadi, F., Joshi, S., Xue, H. and Kushalappa, A.C.** (2019). Genome-wide in silico identification of LysM-RLK genes in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Molecular Biology Reports*, **46**: 5005-5017.
- Nürnbergger, T. and Kemmerling, B.** (2006). Receptor protein kinases–pattern recognition receptors in plant immunity. *Trends in Plant Science*, **11**: 519-522.
- Qiu, W., Feechan, A. and Dry, I.** (2015). Current understanding of grapevine defense mechanisms against the biotrophic fungus (*Erysiphe necator*), the causal agent of powdery mildew disease. *Horticulture Research*, **2**: 15020.
- Sattler, S.E. and Funnell-Harris, D.L.** (2013). Modifying lignin to improve bioenergy feedstocks: strengthening the barrier against pathogens? *Frontiers in Plant Science*, **4**: 70.
- Shiu, S.H., Karlowski, W.M., Pan, R., Tzeng, Y.H., Mayer, K.F. and Li, W.H.** (2004). Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice. *The plant cell*, **16**: 1220-1234.
- Sohrabi, S.S., Sohrabi, S.M., Mousavi, S.K. and Mohammadi, M.** (2020). Identification, sequencing and stability evaluation of eight reference genes in saffron (*Crocus sativus* L.). *Plan Genetic Researches*, **7(1)**: 127-144 (In Persian).
- Steinkellner, S., Mammerler, R. and Vierheilig, H.** (2008). Germination of *Fusarium oxysporum* in root exudates from tomato plants challenged with different *Fusarium oxysporum* strains. *European Journal of Plant Pathology*, **122**: 395-401.
- Taghikhani, S., Ramshini, H., Sadat-Noori, S.A., Lotfi, M., Izadi Darbakdi, A., Sousaraei, N. and Varvani Farahani, A.** (2018). SNP marker assisted selection for identification of fusarium resistant melon plants. *Plant Genetic Researches*, **5(1)**: 63-76 (In Persian).
- Thrane, U.** (1990). Grouping *Fusarium* section *Discolor* isolates by statistical analysis of quantitative high performance liquid chromatographic data on secondary metabolite production. *Journal of Microbiological Methods*, **12**: 23-39.
- Tirnaz, S., Bayer, P.E., Inturrisi, F., Zhang, F., Yang, H., Dolatabadian, A., Neik, T.X., Severn-Ellis, A., Patel, D.A. and Ibrahim, M.I.** (2020). Resistance gene analogs in the Brassicaceae: Identification, characterization, distribution, and evolution. *Plant Physiology*, **184**: 909-922.
- Tombuloglu, G., Tombuloglu, H., Cevik, E. and Sabit, H.** (2019). Genome-wide identification of Lysin-Motif Receptor-Like Kinase (LysM-RLK) gene family in *Brachypodium distachyon* and docking analysis of chitin/LYK binding. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **106**: 217-225.
- Williams, H.** (1996). Root and stem rot of cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* f. sp. nov. *Plant Disease*, **80**: 313--316.
- Yang, H., Bayer, P.E., Tirnaz, S., Edwards, D. and Batley, J.** (2020). Genome-wide identification and evolution of receptor-like kinases (RLKs) and receptor like proteins (RLPs) in *Brassica juncea*. *Biology*, **10**: 17.
- Yu, X., Feng, B., He, P. and Shan, L.** (2017). From chaos to harmony: responses and signaling upon microbial pattern recognition. *Annual Review of Phytopathology*, **55**: 109-137.
- Zhang, X.C., Wu, X., Findley, S., Wan, J., Libault, M., Nguyen, H.T., Cannon, S.B. and Stacey, G.** (2007). Molecular evolution of lysin motif-type receptor-like kinases in plants. *Plant Physiology*, **144**: 623-636.
- Zipfel, C.** (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology*, **35**: 345-351.