



## Comparative transcriptome analysis and identification of key genes involved in the water deficit (WD) stress response of wheat roots inoculated with arbuscular mycorrhiza

Elahe Dookhe<sup>1</sup>, Alireza Iranbakhsh<sup>1\*</sup>, Iraj Mehregan<sup>1</sup>, Rahim Ahmadvand<sup>2</sup>, Mostafa Ebadi<sup>3</sup>

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of Vegetables Research, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education & Extension Organization, Karaj, Iran.

3. Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

### Abstract

**Aim and Background:** Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) can improve the adaptation and stress tolerance by making changes in the gene expression pattern of the host plant. Therefore, investigating the expression profile of genes induced in the host plants mediated by mycorrhiza is necessary to further understand the molecular mechanisms of response to water stress. This research was conducted with the aim of studying the transcriptomics of wheat roots, in order to identify key genes and molecular mechanisms of mycorrhiza-mediated water deficit (WD) tolerance.

**Materials and Methods:** In the present study, the pattern of expression of *Triticum aestivum* L. roots (Chamran Cultivar) inoculated with AMF, *Funneliformis mosseae* was investigated. For this purpose, four different treatment combinations were performed: inoculated plants under water deficit condition (AMF+/WD), inoculated plants under normal irrigation (AMF+/Ctrl), non-inoculated plants under water deficit condition (AMF-/WD), non-inoculated plants under normal irrigation (AMF-/Ctrl). Total RNA was extracted from the roots of mycorrhizal and non-mycorrhizal plants and cDNA libraries were built and sequenced with Illumina technology.

**Results:** The result showed that 235 differentially expressed genes (DEGs) were detected from 4 different comparisons. Based on Venn diagram analysis, 70 water deficit responsive DEGs were identified that were regulated by AMF exclusively under water deficit (WD) stress.

**Conclusion:** Gene ontology (GO) enrichment and KEGG analysis showed that DEGs are involved in many different pathways including the regulation of the cellular redox state, and osmotic regulation such as proline biosynthesis, cell wall synthesis and formation. The data shows that symbiosis with AMF under water deficit (WD) stress, changes the expression of response to stress genes that leads to higher adaptation to water deficit (WD). These genes can be used in breeding programs and genetic engineering to improve wheat tolerance to water deficit conditions.

**Keywords:** Water Deficit (WD), Transcriptome, Wheat, Mycorrhizal symbiosis, Proline, Iau Science

### Corresponding author:

Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Email: : iranbakhsh@iaa.ac.ir



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

## آنالیز مقایسه‌ای ترانسکریپتوم و شناسایی ژن‌های کلیدی مقاومت به کم‌آبی در ریشه گندم تلقیح‌شده با میکوریزا آربوسکولار

الهه دوخه<sup>۱</sup>، علیرضا ایرانبخش<sup>۱\*</sup>، ایرج مهرگان<sup>۱</sup>، رحیم احمدوند<sup>۲</sup>، مصطفی عبادی<sup>۳</sup>

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۳. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار (AMF) با ایجاد تغییراتی در الگوی بیان ژن‌های گیاه میزبان می‌توانند سازگاری و تحمل به تنش را در گیاه بهبود بخشند. بنابراین بررسی پروفایل بیانی ژن‌های القا شده توسط میکوریزا در گیاه میزبان، برای درک بیشتر سازوکارهای مولکولی پاسخ به تنش کم‌آبی ضروری است. این مطالعه با هدف بررسی ترانسکریپتومی ریشه گندم، به منظور شناسایی ژن‌های کلیدی و مکانیزم‌های تحمل به کم‌آبی به واسطه همزیستی میکوریزایی انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در تحقیق حاضر، الگوی ترانسکریپتوم ریشه گندم نان<sup>۱</sup> (رقم چمران) تلقیح شده با قارچ میکوریزا آربوسکولار<sup>۲</sup> در ۴ تیمار: گیاهان تلقیح شده با میکوریزا در شرایط کم‌آبی (AMF+/WD)، گیاهان تلقیح شده با میکوریزا در شرایط آبیاری نرمال (AMF+/Ctrl)، گیاهان تلقیح نشده تحت شرایط کم‌آبی (AMF-/WD) و گیاهان تلقیح نشده در شرایط آبیاری نرمال (AMF-/Ctrl) بررسی شد. RNA کل از ریشه گیاهان میکوریزایی و غیرمیکوریزایی استخراج شد و کتابخانه‌های cDNA با فناوری ایلومینا ساخته و توالی‌یابی شدند.

**یافته‌ها:** در مجموع ۲۳۵ ژن با بیان افتراقی<sup>۳</sup> (DEGs) از ۴ مقایسه شناسایی شد. براساس تجزیه و تحلیل نمودار Venn، ۷۰ ژن پاسخ‌دهنده به تنش کم‌آبی با تغییر بیان افتراقی شناسایی شد که به‌طور انحصاری به‌واسطه همزیستی AMF القاء می‌شوند.

**نتیجه‌گیری:** تجزیه و تحلیل انتولوژی ژن<sup>۴</sup> (GO) و KEGG نشان داد ژن‌های DEG در مسیرهای مختلف و متعددی مشارکت دارند. بیشترین تعداد DEG‌ها در مسیرهای بیوسنتز و شکل‌گیری دیواره سلولی، تنظیم ردوکس سلولی و تنظیم اسمزی نظیر بیوسنتز پرولین، شناسایی شدند. این نتایج نشان می‌دهد میکوریزا با اعمال تنظیمات دقیق، بیان ژن‌های کلیدی پاسخ به استرس در ریشه گیاه را تغییر می‌دهد و بر ظرفیت سازگاری گیاه گندم در طول کمبود آب می‌افزاید. از این ژن‌ها می‌توان در برنامه‌های اصلاحی و مهندسی ژنتیک گندم جهت بهبود تحمل به کم‌آبی استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** تنش کم‌آبی (WD)، ترانسکریپتوم، گندم، همزیستی میکوریزایی، پرولین، Iau Science.

### نویسنده مسئول:

گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.  
پست الکترونیکی: iranbakhsh@iau.ac.ir  
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۰۵  
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۳

<sup>۱</sup>- *Triticum aestivum* .L

<sup>۲</sup>- *Funneliformis mosseae*

<sup>۳</sup>- Differentially expressed genes (DEGs)

<sup>۴</sup>- Gene Ontology (GO)

## مقدمه

گندم یکی از اولین غلات اهلی شده است که طی ۸۰۰۰ سال گذشته، بیشترین اهمیت را در تغذیه انسان به خود اختصاص داده است (<https://www.fao.org>). گندم با حدود ۷۸۰ میلیون تُن تولید سالانه در بیش از ۲۴۰ میلیون هکتار، پس از برنج، دومین و مهم‌ترین محصول زراعی از نظر امنیت غذایی است (۱). با توجه به تغییرات شدید و سریع اقلیم جهان و نیز افزایش گرمایش جهانی، محدودیت منابع آبی، چالش اصلی در تولید محصولات کشاورزی است (۲). تنش کم‌آبی (WD) یک مشکل جهانی و یکی از عوامل محدودکننده رشد و نمو گندم است که از جدی‌ترین تهدیدها برای تولید گیاهان زراعی به‌ویژه در ایران به‌شمار می‌رود (۳).

هنگامی که گیاهان با تنش WD روبرو می‌شوند سیگنال‌های تنشی ابتدا توسط ریشه گیاه دریافت و آغازگر آبخار پیام-رسانی از ریشه به شاخه‌ها می‌شود (۴،۵). این مسیرهای پیام-دهی در سطح ریختی، آناتومیک و هیستوشیمیایی آشکار می‌شوند که با تغییرات قابل توجهی در پاسخ فیزیو-مولکولی گیاه همراه هستند (۵،۶).

گیاهان، استراتژی‌های ذاتی متفاوتی را برای مقابله با تنش آبی ایجاد کرده‌اند که شامل پاسخ‌های سیگنالینگ، مانند  $Ca^{2+}$ ، پروتئین‌کینازها، هورمون‌های گیاهی و پاسخ‌های سازگاری نهایی مانند تولید اسمولیت‌های سازگار به‌خصوص پرولین، حذف و جداسازی یون‌ها، مهار گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و تنظیم رشدونمو گیاه است (۷). با این حال، واقعیتی که نمی‌توان نادیده گرفت این است که ۴۰ تا ۶۰ درصد اراضی کشاورزی در سرتاسر جهان تحت تأثیر خشکی قرار دارند. بنابراین، بررسی استراتژی‌های مختلف برای مهندسی افزایش تحمل به کم‌آبی در گیاهان و بهبود بهره‌وری آنها در شرایط تنش کم‌آبی چالش مهمی برای محققان است. علاوه بر سازوکارهای ذاتی گیاه برای مقابله با تنش آبی، یکی از راه‌کارهای مقابله با شرایط تنش خشکی بهره‌گیری از همزیستی میکوریزایی است (۸). بیش از ۸۰٪ گیاهان عالی قادر به تثبیت همزیستی با قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار (AMF) هستند. همزیستی میکوریزایی، ارتباطی دوطرفه است، قارچ‌های میکوریزا مواد فتوسنتزی را از گیاه میزبان دریافت می‌کنند و در مقابل جذب رطوبت و مواد غذایی خاک توسط گیاه را افزایش می‌دهند. مطالعات نشان داده‌اند که AMF با بهبود تنظیم اسمزی ریشه و حفظ شیب پتانسیل آب برای ورود از خاک به ریشه، از گیاهان در برابر تنش

خشکی حفاظت می‌کنند و زنده‌مانی گیاهان را در بوم‌های تنشی افزایش می‌دهند. تلقیح AMF تحت تنش آبی، رشد و بازده گیاه را افزایش می‌دهد و باعث افزایش تحمل گیاه به خشکی می‌شود (۹). در هر حال، مکانیزم‌های سازگاری با تنش WD، دربرگیرنده بازبرنامه‌ریزی گسترده فرآیندهای بیان ژن و رونویسی است که مجموعه‌ای از تغییرات در سطح ریختی، تشریحی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی را به دنبال دارد و مانع از دست دادن آب و مقاومت گیاه می‌شود (۱۰،۱۱). بنابراین، درک بیشتر مکانیزم‌های مولکولی و شناسایی مسیرها و شبکه‌های ژنی موثر در پاسخ به کم‌آبی برای گسترش وارپته‌ها مقاوم غلات ضروری است (۱۱،۱۲،۱۳). توالی‌یابی RNA (RNA-seq) از جدیدترین فناوری‌های مولکولی است که با آنالیزهای گسترده‌ی ترانسکریپتوم، برای توصیف سطوح بیان ژن‌ها و شبکه تنظیمی ژنی استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر، تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم، با استفاده تکنیک RNA-seq، برای شناسایی و کشف ژن‌های عملکردی و پروفایل بیانی آن‌ها در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۴،۱۳،۱۰). هدف از این تحقیق، بررسی ترانسکریپتوم و شناسایی ژن‌های کلیدی مقاومت به WD در ریشه گندم تلقیح‌شده با میکوریزا با بهره‌گیری از تکنولوژی توالی‌یابی RNA (RNA-seq) است. همچنین جهت تایید و اعتبارسنجی نتایج حاصل از تعیین توالی‌یابی RNA، بیان پنج ژن DEG با تکنیک Time-Real PCR مورد سنجش قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

## رشد گیاه

در این تحقیق نمونه‌های گیاهی شامل بذره‌های گندم نان رقم چمران از موسسه تحقیقات تهیه و اصلاح نهال و بذر کرج فراهم شد. رقم چمران دارای تیپ رشدی بهاره است و حداکثر ارتفاع آن به ۹۵ سانتی‌متر می‌رسد. دارای کودپذیری مناسب و مقاومت به خوابیدگی است. وزن هزار دانه آن حدود ۳۹ گرم، دانه‌های زرد رنگ، زودرس و متحمل نسبت به کم‌آبی و گرمای آخر فصل، حساس به زنگ گندم است. دلیل انتخاب این رقم به خاطر قابل کشت بودن آن برای هر دو نوع کشت آبی و دیم می‌باشد که البته روش ترجیحی کشت دیم است.

بیوانالیزور ۲۱۰۰ Agilent بررسی شد و مجموعه RNA حاصل از استخراج برای ساخت کتابخانه cDNA و توالی‌یابی استفاده گردید. جهت توالی‌یابی دوطرفه (paired end) از قطعات ۱۵۰ جفت‌بازی با دستگاه Illumina HiSeq 2000 انجام شد.

**نقشه‌یابی با استفاده از ژنوم مرجع، تجزیه بیان ژن و شناسایی ژن‌های افتراقی**

کنترل کیفیت داده‌های خام توالی‌یابی توسط نرم‌افزار FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) انجام شد و طی آن آداپتورها، آغازگرها و توالی‌های بی کیفیت حذف شدند. سپس با نرم‌افزار HISAT2 (<https://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>) خوانش‌ها هم‌ردیف (Align) شدند (۱۵). خوانش‌های دارای کیفیت بالا روی ژنوم به‌عنوان ژنوم مرجع *Triticum aestivum* نقشه‌یابی شدند ([ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/plants/release39/fasta/triticum\\_aestivum/dna/](ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/plants/release39/fasta/triticum_aestivum/dna/)) و سپس ترانسکریپتوم توسط نرم‌افزار Cufflinks V 2.2.1 (<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>) سرهم‌بندی شد (۱۶). شناسایی ژن‌های دارای بیان افتراقی در مقایسه تیمارها با استفاده از نرم‌افزار Cuffdiff انجام شد (۱۷). بدین منظور شاخص FPKM<sup>۲</sup> میزان بیان هر ترانسکریپت از طریق ارزش قطعه بر کیلو باز بر میلیون خوانش ترسیم شد، سپس مقدار Log<sub>2</sub> از نسبت این شاخص برای تک‌تک ژن‌ها در نمونه‌های مورد مقایسه بدست آمد و ژن‌های بزرگتر یا مساوی ۲ و دارای  $p\text{-Value} \leq 0.05$  به‌عنوان معیار معنی‌داری ژن‌های افتراقی در نظر گرفته شدند. برای بررسی آماری در مورد بیان ژن‌ها از GraphPad Prism 9.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) استفاده شد.

#### تفسیر KEGG و GO

تجزیه و تحلیل انتولوژی ژن با استفاده از بانک اطلاعاتی Shinny GO v0.61 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) یا AgriGO V2 (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/>).

از قارچ میکوریزا آربوسکولار<sup>۱</sup> به منظور ایجاد همزیستی استفاده شد. این گونه یکی از رایج‌ترین گونه‌های مورد استفاده جهت ایجاد همزیستی با گیاهان و بهبود ویژگی‌های گیاه می‌باشند. نمونه قارچ میکوریزایی آربوسکولار نیز به صورت اسپور از دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد رفسنجان، تهیه گردید. این مطالعه با در نظر گرفتن دو فاکتور شامل فاکتور تلقیح (در دو سطح گیاهان شاهد بدون میکوریزا و گیاهان تلقیح شده با میکوریزا آربوسکولار) و فاکتور تنش کم‌آبی (در دو سطح گیاهان با آبیاری نرمال و گیاهان در شرایط کم‌آبی) انجام شد. بدین ترتیب تعداد چهار تیمار شامل: گیاهان گندم تلقیح شده با میکوریزا در شرایط کم‌آبی (AMF+/WD)، گیاهان تلقیح شده با میکوریزا در شرایط آبیاری نرمال (AMF+/Ctrl)، گیاهان تلقیح نشده تحت شرایط کم‌آبی (AMF-/WD) و گیاهان تلقیح نشده در شرایط آبیاری نرمال (AMF-/Ctrl) و ۳ تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد. برای هر یک از گلدان‌های دارای میکوریزا، مقدار ۱۲/۵ گرم اسپور وزن شد و با خاک آن‌ها مخلوط گردید. پس از آن، تعداد ۱۵ بذر با فواصل منظم در عمق ۵-۳ سانتی‌متری خاک گلدان‌های نیم‌لیتری کشت شد. آزمایش در شرایط گلخانه‌ای با دوره نوری (۸:۱۶) ساعت روشنایی: تاریکی، دمای ۱۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰±۵ درصد انجام شد. جهت فراهم کردن شرایط تلقیح و جلوگیری از هرگونه تنش، آبیاری با آب مقطر و به صورت روزانه صورت گرفت. اعمال تنش WD سه هفته پس از کشت آغاز گردید تا گیاهان رشد کافی کنند و همزیستی صورت گیرد. برای اطمینان از همزیستی قارچ با ریشه گیاهان از روش Phillips and Hayman (۱۹۷۰) استفاده شد. سپس تیمارهای تنش به این صورت اعمال شد: آبیاری سه مرتبه در هفته و هر بار ۵۰ میلی‌لیتر برای گلدان‌های در شرایط نرمال و ۲۵ میلی‌لیتر برای گلدان‌های در شرایط WD.

#### استخراج RNA، ساخت کتابخانه cDNA و توالی‌یابی

مراحل استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNeasy Plant Mini Kit شرکت کایژن بر اساس پروتکل شرکت سازنده (Qiagen-Germany) انجام گرفت. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده توسط نانودراپ ۸۰۰۰ و

<sup>۱</sup>- *Funneliformis mosseae*

<sup>۲</sup>- Fragment Per Kilobase Transcript per Million reads

برای ژن‌های شناخته‌شده و دارای شناسه GO انجام شد. اطلاعات مربوط به مسیرهای زیستی از در بانک اطلاعاتی KEGG (<http://www.kegg.jp/blastkoala/>) و واژه‌های انتولوژی ژن (GO) مرتبط با ژن‌های همولوگ شناسایی شده از بانک اطلاعاتی Uniprot استخراج شد. جهت آزمون معنی‌داری از روش آماری hypergeometric و روش تعدیل چند آزمونه Yekutieli استفاده شد. تجزیه فرمایش (Overrepresentation) مسیر KEGG با استفاده از آزمون hypergeometric در نرم‌افزار R انجام شد. مسیرهای معنی‌داری از طریق حد آستانه دارای  $p\text{-Value} \leq 0.05$  انتخاب شدند.

تایید نتایج RNA-Seq به روش qRT-PCR جهت تایید داده‌های RNA-Seq، پنج ژن از میان ژن‌های دارای بیان افتراقی در مقایسه (AMF-/WD) و

### تایید نتایج RNA-Seq به روش qRT-PCR

جهت تایید داده‌های RNA-Seq، پنج ژن از میان ژن‌های دارای بیان افتراقی در مقایسه (AMF-/WD) و

جدول ۱- لیست و توالی پرایمرهای Forward و Reverse ژن‌های مورد بررسی.

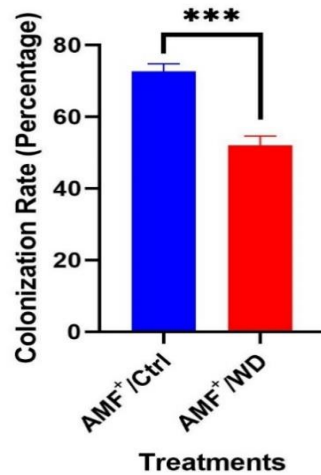
پرایمر (۵'→۳')	پرایمر (۵'→۳')	نام ژن
CACGACTTGTACACTTGGG	GACTACTACCCGTCACGCC	TraesCS6D02G048300
TTGAGGCAGTATTCGTCGGA	CAAGGTGAAGGAGGAGCTGA	TraesCS2A02G083700
GGTGTCTCAAGCAGAATCG	GTCGTGCTCTGTTTCTCG	TraesCS7D02G195400
ACCTCTCCACGTATTTCCC	CATGCTGTGTATCAAGCCGG	TraesCS5B02G376900
GTCGTCAAGCAGAATCGAGC	TCTCCCAACTTCTACTCGAGG	TraesCS7D02G369400
CTGTGCATGTGACGGATGAG	ACGTGGATGAGGACCTTGTT	TraesCS6A02G213700 (GAPDH)

شد و در ریشه‌های تلقیح‌نشده هیچ کلونیزاسیونی مشاهده نشد. میزان کلونیزاسیون در ریشه‌های تلقیح‌شده در شرایط کم‌آبی و آبیاری نرمال به ترتیب ۵۲٪، ۷۲/۶۷٪ بود (شکل ۱). اگرچه تیمار کم‌آبی باعث کاهش درصد کلونیزاسیون AMF در ریشه گندم شد اما نمی‌توان نقش تلقیح میکوریزا در کاهش اثرات منفی ناشی از تنش کم‌آبی (WD) را نادیده گرفت.

### یافته‌ها

#### کلونیزاسیون ریشه

ریشه‌های گیاهان تلقیح‌شده و تلقیح‌نشده با قارچ *F. mosseae* پس از رنگ‌آمیزی با محلول رنگی تریپان‌بلو مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند، در ریشه‌های تلقیح‌شده کلونیزاسیون موفقیت‌آمیز قارچ آربوسکولار تأیید



شکل ۱. درصد کلونیزاسیون ریشه گندم با قارچ *F. mosseae* در در شرایط کم آبی و آبیاری نرمال

### توالی‌یابی ترانسکریپتوم

از توالی‌یابی دوطرفه<sup>۱</sup> هشت کتابخانه RNA-Seq ساخته شد که شامل دو تکرار بیولوژیک از هر تیمار است. پس از حذف توالی‌های آداپتور و خوانش‌های دارای کیفیت پایین، به طور متوسط از گروه AMF-/Ctrl (کنترل) ۵۵/۶٪، تیمار AMF-/WD ۴۱/۶۵٪، آبیاری AMF+/Ctrl ۵۰/۳٪ و

AMF+/WD ۵۰/۵۵٪ خوانش با کیفیت بالا بر روی ژنوم مرجع گندم نقشه‌یابی (Map) شد. در مجموع ۱۲۰ گیگابایت داده به دست آمد و پس از مونتاژ، در مجموع ۱۱۴۴۲۸ ژن شناسایی شد، که حدود ۱۲۷۷۴ ژن DEG بودند (جدول ۲). بر اساس یافته‌های GO، ۱۰۰۰ ژن کاندید که در پاسخ‌های دفاعی نقش دارند مورد آنالیزهای بعدی قرار گرفتند.

<sup>۱</sup> - Paired-end

جدول ۲. نتایج حاصل از توالی‌یابی RNA-Seq

نام تیمار	خوانش تعیین توالی شده	میزان نقشه‌یابی کل خوانش (%)	جفت‌های همتراز شده (%)	همترازهای چندتایی	همترازهای نامتوازن (%)	همترازهای متوازن
A (AMF-/WD)	۵۱/۲	۷۵۷۹۵۷ (% ۲/۴)	۲۷۲۰۳۸۷ (% ۸/۷)	۳۱۳۰۴۱۹۹	۵۶/۱	۵۹۶۵۱۲۳۵
B (AMF-/WD)	۵۰/۱	۸۹۸۵۷۳ (% ۲/۸)	۳۱۱۴۲۲۳ (% ۹/۶)	۳۲۴۹۹۹۹۲	۵۵/۱	۶۳۰۹۴۲۸۴
C (AMF+/WD)	۴۴/۹	۱۹۵۱۳۴۲ (% ۶)	(% ۱۷/۱) ۵۶۰۹۷۶۰	۳۲۷۶۲۵۸۸	۵۱/۲	۶۸۵۷۶۳۲۹
D (AMF+/WD)	۴۴/۹	۱۶۲۱۲۶ (% ۴/۳)	(% ۱۳/۵) ۵۱۴۴۱۱۰	۲۹۵۰۳۵۹۷	۴۹/۹	۸۱۰۵۳۶۲۰
E (AMF-/Ctrl)	۳۹/۷	۶۴۲۹۹۸ (% ۲/۲)	۲۷۰۸۰۳۸ (% ۹/۲)	۲۲۶۴۳۱۳۲	۴۴/۶	۷۲۶۱۸۵۵۵
F (AMF-/Ctrl)	۳۳/۵	(% ۵/۴) ۱۲۱۷۹۲۴	(% ۱۸/۱) ۴۰۹۲۳۶۸	۲۹۴۸۸۹۱۰	۳۸/۷	۶۳۹۰۵۵۷۹
G (AMF+/Ctrl)	۴۵	۶۵۶۵۳۹ (% ۲/۲)	۲۵۴۸۷۸۹ (% ۸/۶)	۲۸۴۷۳۹۰	۴۹/۴	۶۴۰۶۷۰۷۹
H (AMF+/Ctrl)	۴۶/۵	۷۴۲۲۷۴ (% ۲/۶)	۲۵۴۸۷۸۹ (% ۸/۶)	۲۸۶۷۳۹۰	۵۱/۲	۵۹۹۶۶۷۳۱

## شناسایی DEGs

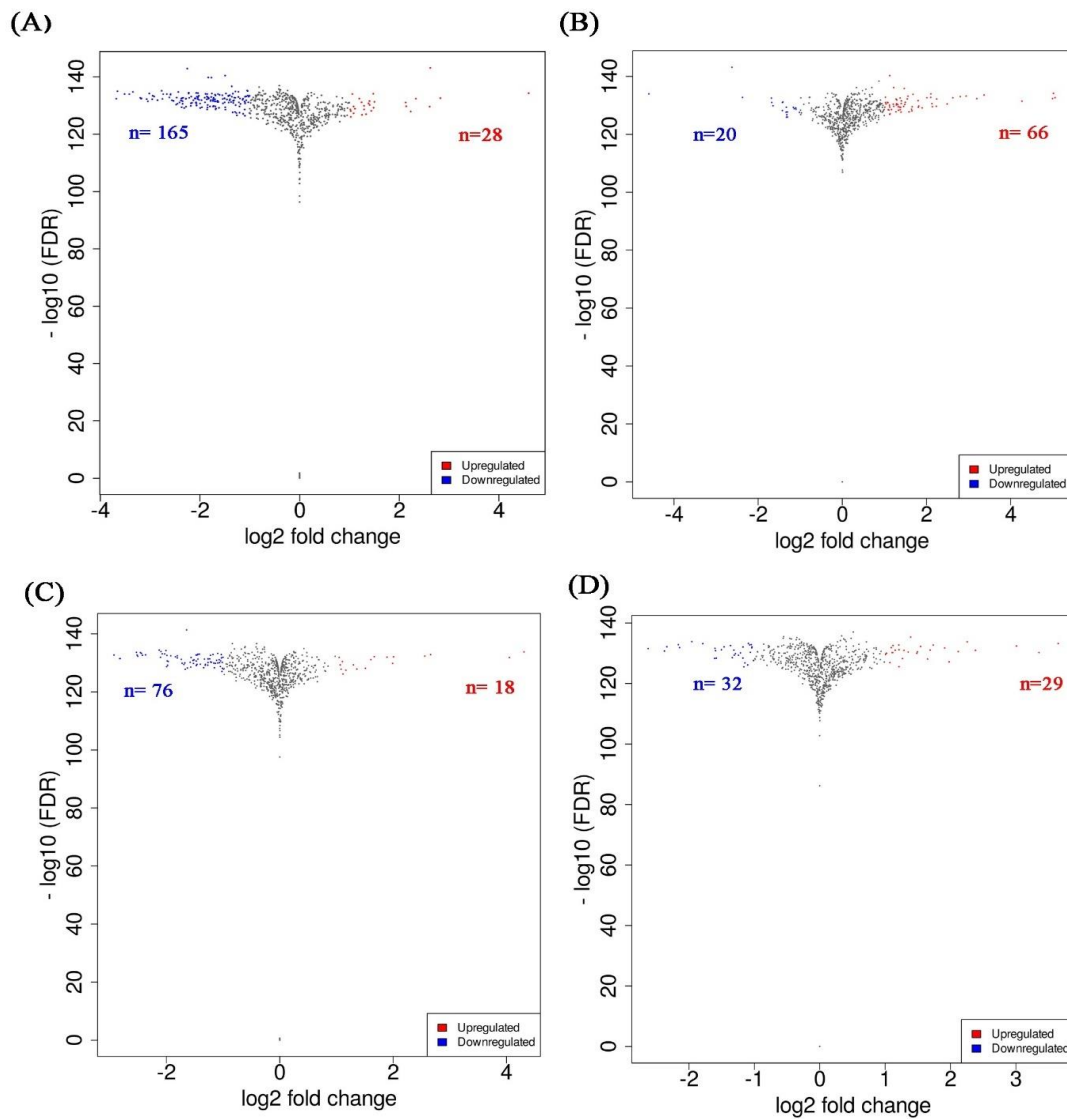
نمودارهای آتش‌فشانی، توزیع کلی DEGs در ریشه گندم در پاسخ به تنش کم‌آبی و تلقیح میکوریزایی را نمایش می‌دهند (شکل ۲). در مجموع، تعداد ۱۹۳ ژن با بیان افتراقی در گیاهان تلقیح‌نشده تحت تنش کم‌آبی شناسایی شد (شکل ۲A). در مقایسه گیاهان تلقیح‌شده با AMF با گیاهان تلقیح‌نشده ۸۶ ژن در شرایط تنش کم‌آبی (شکل ۲B) و ۹۴ ژن در شرایط آبیاری نرمال (شکل ۲C) بیان افتراقی نشان دادند. همچنین در گیاهان تلقیح‌شده با AMF ۶۱ ژن دارای بیان افتراقی تحت شرایط استرس کم‌آبی شناسایی شد (شکل ۲D). بررسی آماری میزان بیان ژن‌ها نشان داد، بیشترین تعداد DEGs مربوط به مقایسه گیاهان تلقیح‌نشده تحت شرایط تنش کم‌آبی (AMF-/WD و AMF-/Ctrl) است که نشان‌گر اثرات تنش غیرزیستی است. در این مقایسه تعداد

ژن‌های کاهش بیان‌یافته در پاسخ به کم‌آبی، بیش از پنج برابر تعداد ژن‌های افزایش بیان‌یافته است (۵/۸۹۲ =

$$\text{Ratio Downregulated/Upregulated}$$

جالب آنکه تحت شرایط کم‌آبی مقایسه گیاهان تلقیح‌شده با AMF با گیاهان تلقیح‌نشده (AMF-/WD) و (AMF+/WD) نشان داد، تعداد DEGsهای افزایش بیان‌یافته بیش از سه برابر تعداد ژن‌هایی است که کاهش بیان داشته‌اند (Ratio Upregulated/Downregulated = ۳/۳). در این

مقایسه که نشان‌گر اثرات هر دو تنش‌های غیرزیستی و زیستی است، از مجموع ۸۶ ژن با بیان افتراقی ۲۰ ژن کاهش بیان و ۶۶ ژن افزایش بیان داشتند.



شکل ۲. نمودار آتش‌فشانی ژن‌های DEGs، تعداد DEGs افزایش و کاهش بیان‌یافته در ریشه گیاه گندم، در ۴ مقایسه (A-D).

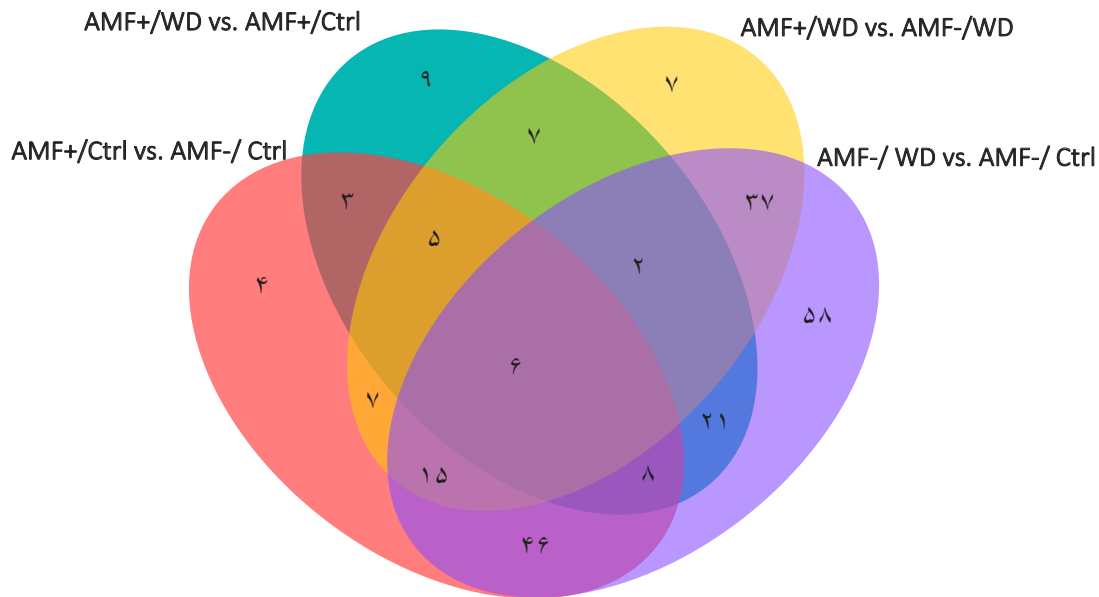
بیش از ۲ برابری و احتمال خطای کمتر از پنج‌صدم (  $p\_value \leq 0.05$  ،  $-2 < \text{Fold Change} < +2$  ) به‌عنوان معیار معنی‌داری ژن‌های دارای بیان افتراقی در نظر گرفته شد. نقاط قرمز ژن‌های افزایش بیان‌یافته و آبی کاهش بیان‌یافته را نشان می‌دهند که دارای بیان معنی‌دار هستند، نقاط سیاه مربوط به ژن‌هایی است که تفاوت بیان معنی‌داری ندارند.

ژن‌های DEGs در ریشه گیاه گندم: (A) تلقیح‌نشده در شرایط کم‌آبی نسبت به کنترل (آبیاری نرمال) (AMF- /WD vs. AMF-/Ctrl) ، (B) تلقیح‌شده در مقایسه با تلقیح‌نشده تحت شرایط کم‌آبی (AMF+/WD vs. AMF- /WD) ، (C) تلقیح‌شده در مقایسه با تلقیح‌نشده در شرایط کنترل (آبیاری نرمال) (AMF+/Ctrl vs. AMF- /Ctrl) و (D) تلقیح‌شده در شرایط کم‌آبی نسبت شرایط کنترل (آبیاری نرمال) (AMF+/WD vs. AMF+/Ctrl). تغییرات

بیان افتراقی ژن‌های القاء شونده توسط میکوریزا در پاسخ به تنش کم‌آبی در ریشه گندم از نمودار Venn برای مقایسه دوه‌دو تیمارها و بررسی دقیق‌تر روابط بین ژن‌های بیان افتراقی استفاده شد (شکل ۳). به‌منظور شناسایی ژن‌های القاء‌شده توسط AMF که منحصراً تحت تنش کم‌آبی بیان افتراقی داشتند، DEG‌های انحصاری (مختص هر یک از تیمارها) و مشترک بین تیمارهای مختلف تعیین شد. میزان هم‌پوشانی در مقایسه گیاهان تلقیح‌شده با تلقیح‌نشده تحت شرایط تنش کم‌آبی (AMF-/WD) و (AMF+/WD) و در شرایط آبیاری نرمال (AMF-/Ctrl) و (AMF+/Ctrl) مورد ارزیابی قرار گرفت. ۳۳ ژن با بیان افتراقی در دو گروه مشترک بود و ۵۳ ژن به‌طور اختصاصی در مقایسه AMF+/WD و AMF-/WD تفاوت بیان معنی‌دار نشان دادند. علاوه بر این، ۳۷ ژن مشترک از مقایسه دو گروه گیاهان غیرمیکوریزایی در شرایط AMF-/Ctrl و AMF-/WD با گیاهان میکوریزایی در شرایط AMF+/Ctrl و AMF+/WD شناسایی شد. از مقایسه گیاهان

بیان افتراقی ژن‌های القاء شونده توسط میکوریزا در پاسخ به تنش کم‌آبی در ریشه گندم

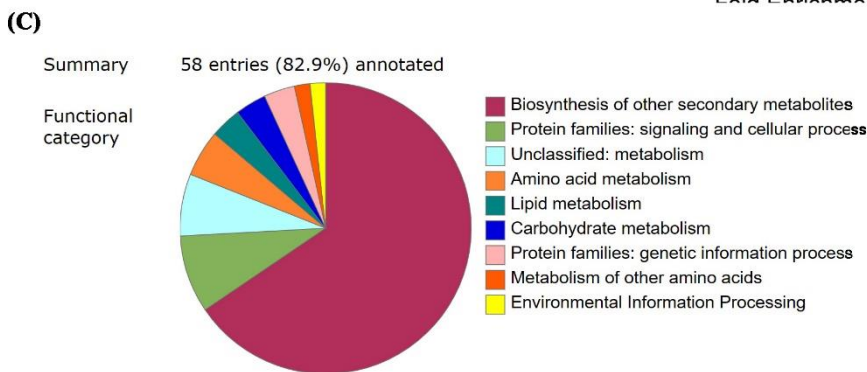
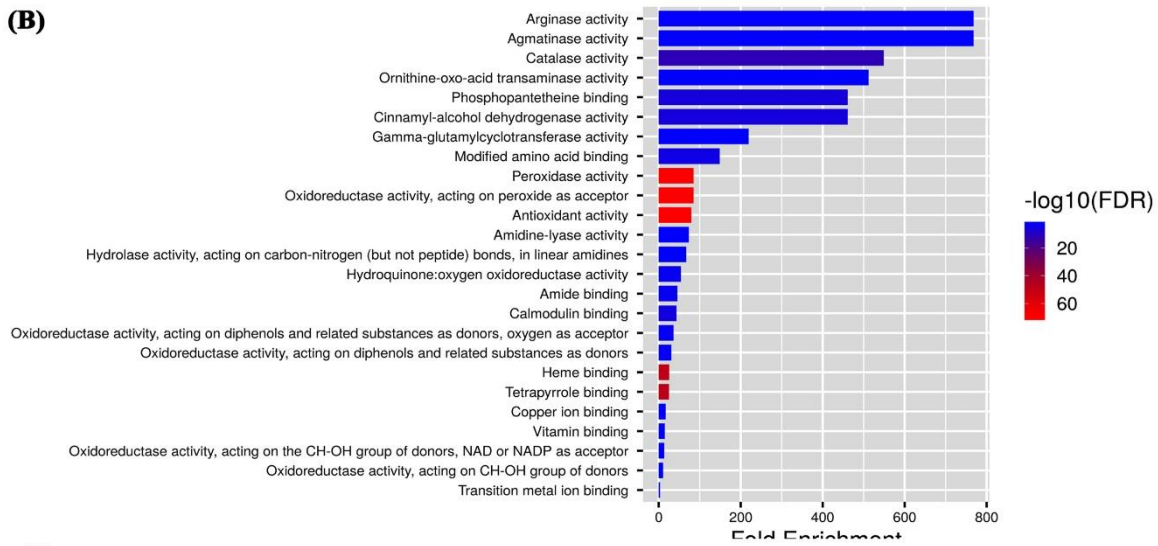
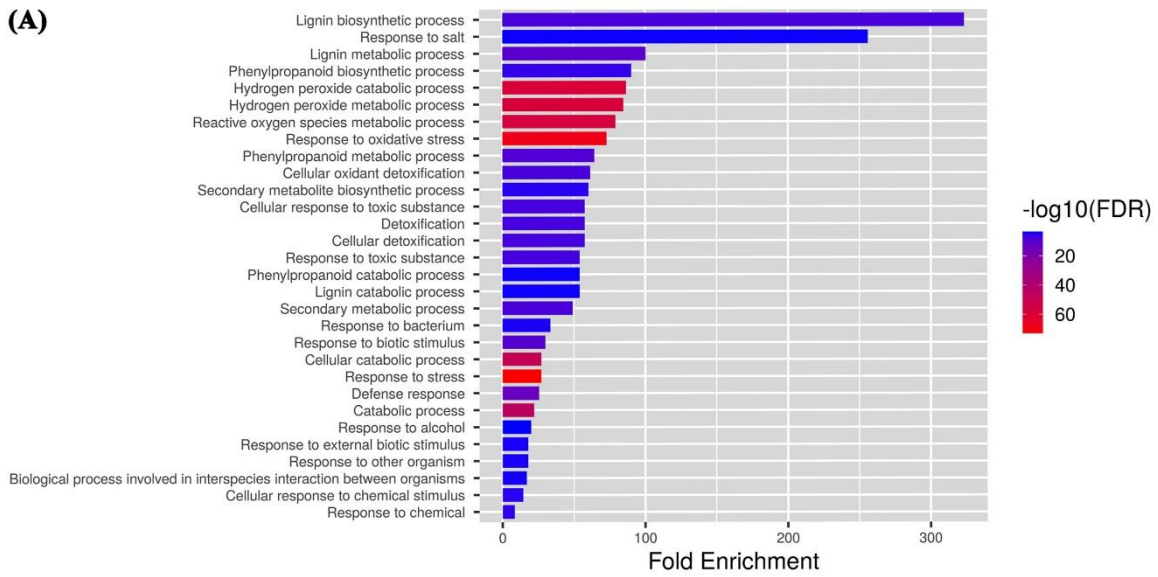
از نمودار Venn برای مقایسه دوه‌دو تیمارها و بررسی دقیق‌تر روابط بین ژن‌های بیان افتراقی استفاده شد (شکل ۳). به‌منظور شناسایی ژن‌های القاء‌شده توسط AMF که منحصراً تحت تنش کم‌آبی بیان افتراقی داشتند، DEG‌های انحصاری (مختص هر یک از تیمارها) و مشترک بین تیمارهای مختلف تعیین شد. میزان هم‌پوشانی در مقایسه گیاهان تلقیح‌شده با تلقیح‌نشده تحت شرایط تنش کم‌آبی (AMF-/WD) و (AMF+/WD) و در شرایط آبیاری نرمال (AMF-/Ctrl) و (AMF+/Ctrl) مورد ارزیابی قرار گرفت. ۳۳ ژن با بیان افتراقی در دو گروه مشترک بود و ۵۳ ژن به‌طور اختصاصی در مقایسه AMF+/WD و AMF-/WD تفاوت بیان معنی‌دار نشان دادند. علاوه بر این، ۳۷ ژن مشترک از مقایسه دو گروه گیاهان غیرمیکوریزایی در شرایط AMF-/Ctrl و AMF-/WD با گیاهان میکوریزایی در شرایط AMF+/Ctrl و AMF+/WD شناسایی شد. از مقایسه گیاهان



شکل ۳. نمودار ون، DEG‌های اختصاصی و مشترک را بین جفت گروه‌ها در ۴ مقایسه نشان می‌دهد.

به منظور بررسی نقش میکوریزا در بهبود تحمل به کم‌آبی، تجزیه و تحلیل‌های GO و مسیر KEGG برای DEG‌های القاشده توسط میکوریزا در پاسخ به WD انجام شد. ژن‌هایی با حداقل ۱ واژه GO، بر اساس آزمون Bonferroni در  $FDR < 0.05$  برای توصیف فرآیندهای زیستی (BP)، عملکردهای مولکولی (MF) و جایگاه سلولی (CC) گروه‌بندی شدند (شکل B و ۴A). تحلیل GO نشان داد که بسیاری از MFها مربوط به فعالیت پراکسیداز، اکسیدوردوکتاز، آنتی‌اکسیدانت، سینامول الکل دهیدروژناز، اکسیدوردوکتاز، کاتالاز، آرژیناز، هیدرولاز، ترانس‌آمیناز، تنظیم‌کننده آنزیمی، کاتالیزکننده، انتقال‌دهنده (برای مثال O-متیل ترانسفرازی)، اتصال (برای مثال اتصال به کاتیون، یون فلزی، روی، مس، ویتامین، پروتئین) می‌باشد و BPها شامل پاسخ دفاعی، پاسخ ایمنی، واکنش به محرک‌ها (برای مثال پاسخ به استرس، استرس اکسیداتیو، پاسخ به محرک زیستی)، فرآیندهای متابولیک و فرآیندهای بیوسنتزی (برای مثال متابولیت‌های ثانویه، پرولین و لیگنین) می‌باشند. آنالیز فرآیندهای KEGG برای تعیین مسیرهای متابولیسمی DEG‌های القاشده توسط میکوریزا در پاسخ به

WD صورت گرفت. از میان ۷۰ ژن DEG تعداد ۵۸ ژن در ۲۳ مسیر بیوشیمیایی و ۷ زیرگروه KEGG، طبقه‌بندی شدند. مسیرها با بیشترین تعداد DEG‌ها غنی‌شده شامل «مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه» (01110) با ۴۵ ژن، «مسیر متابولیک» (01100) با ۴۴ ژن و پس از آن «بیوسنتز فنیل پروپانوئید» (00940) با ۳۹ ژن بودند. سایر مسیرهای شاخص، شامل متابولیسم کربن (01200) با ۲ ژن، بیوسنتز آمینواسیدها (01230) با یک ژن، متابولیسم گلی‌اکسالات و دی‌کربوکسی‌لات (00630) با ۲ ژن، متابولیسم  $\alpha$ -لینولئیک اسید (00592) با ۲ ژن، بیوسنتز آرژنین (00220) با ۱ ژن، متابولیسم آرژنین و پرولین (00330) با ۲ ژن، بیوسنتز تریپتوفان (00380) با ۳ ژن، متابولیسم گلوکوتایون (00480) با ۱ ژن می‌شود. همچنین، در مسیر سیگنالینگ MAPK (04016) ۳ ژن، برهم‌کنش گیاه-پاتوژن (04626) یک ژن و در بخش فرآیندهای سلولی پراکسی‌زوم (04146) با ۲ ژن غنی شد (شکل ۴C). این نتایج نشان‌دهنده اهمیت این مسیرها در شرایط کم‌آبی است که توسط میکوریزا در ریشه گیاهان گندم القا شده‌اند.



شکل ۴. بررسی GO و طبقه‌بندی عملکردی مسیرهای متابولیکی KEGG. (A) فرآیند زیستی (B) عملکرد مولکولی (C) مسیر متابولیسم KEGG.

## واژه‌های GO منحصر به تنش WD در ریشه گندم میکوریزایی

افزون بر بررسی‌های فوق، مقایسه GO برای DEGها در تیمار AMF+/Ctrl و AMF+/WD، با DEGها در تیمار AMF-/Ctrl و AMF-/WD انجام شد. آنالیز GOهای DEGها نشان داد واژه‌های GO مرتبط با فعالیت کاتالیتیک<sup>۸</sup>، اتصال<sup>۹</sup>، فعالیت آنتی‌اکسیدان<sup>۱۰</sup>، فعالیت تنظیم‌کننده آنزیم<sup>۱۱</sup>، فعالیت ترانس‌سای مولکولی<sup>۱۲</sup>، فعالیت پراکسیداز<sup>۱۳</sup> و فاکتورهای رونویسی متصل‌شونده به توالی DNA<sup>۱۴</sup> به صورت مشترک در هر دو مقایسه با امتیاز بالایی غنی شدند. قابل ذکر است برخی DEGهای مشترک که واژه‌های GO ذکر شده در بالا را اشباع کردند، در یک مقایسه بیان افزایشی داشتند و در مقایسه دیگر کاهش بیان یافته بودند. علاوه بر این، برخی واژه‌های GO به طور انحصاری در گیاهان تلقیح‌شده با AMF در شرایط تنش WD غنی شدند: مانند فعالیت کاتالاز<sup>۱۵</sup>، فعالیت هیدرولاز<sup>۱۶</sup>، فعالیت N-rRNA گلیکوزیلاز<sup>۱۷</sup>، فعالیت RNA گلیکوزیلاز<sup>۱۸</sup>، فعالیت اتصال فسفوپانتتین<sup>۱۹</sup> و فعالیت داکسیژناز<sup>۲۰</sup>. در دسته BPها پاسخ به ROS، پاسخ به هیدروژن پراکسید، فرآیندهای ریتمیک و سیرکادین ریتمیک، تنظیم پس از رونویسی بیان ژن، تنظیم فرآیند ترجمه، تنظیم منفی فرآیند ترجمه، تنظیم منفی بیان ژن، تنظیم سلولی فرآیند متابولیسم آمیدها، تنظیم منفی سلولی فرآیند متابولیسم آمیدها غنی شدند (جدول ۳). این تفاوت‌ها مکانیزم‌های پیچیده‌ای را پیشنهاد می‌کنند که توسط

میکوریزا ممکن است بر پاسخ گیاهان به تنش WD تأثیر بگذارد.

## الگوی بیان DEGهای درگیر در مهار ROS و فرآیندهای کلیدی متابولیک سلولی القاشده توسط AMF در شرایط تنش WD

مرتبط با مهار ROS و فرآیندهای متابولیک سلولی، الگوهای بیانی DEGها در مقایسه گیاهان میکوریزایی با گیاهان غیرمیکوریزایی در شرایط تنش AMF-/WD و AMF+/WD بیشتر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (شکل ۵). در مسیر بیوسنتز پرولین دو ژن کدکننده اورنیتین آمینوترانسفراز (OAT) و آرژیناز (ARG) کاهش بیان داشتند، متابولیسم پرولین و آرژنین از مهم‌ترین مسیرهای متابولیسم آمینو اسیدها است که به سنتز پرولین منجر می‌شود. با تلقیح AMF، بیشتر DEGهای کدکننده اعضای سیستم مهار ROS، از جمله ۴۰ از ۵۱ ژن کدکننده پراکسیداز (POD)، ۵ ژن کدکننده کاتالاز (CAT) و یک ژن کدکننده سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، تحت تنش کم‌آبی افزایش بیان نشان دادند. علاوه بر این، در پاسخ متابولیسم سلولی به تلقیح AMF، بخش قابل توجهی از ژن‌های دخیل در سنتز و شکل‌گیری دیواره سلولی، تحت تنش کم‌آبی، افزایش بیان نشان داشتند. بیشتر ژن‌های کدکننده POD، یک ژن کدکننده لاکیز (LAC)، ۳ ژن کدکننده CAD و یک ژن کدکننده O-متیل‌ترانسفراز (OMT) که نقش‌های کلیدی در ساختن و رسوب لیگنین دارند، با تلقیح AMF در شرایط تنش کم‌آبی افزایش بیان داشتند (شکل ۶).

<sup>۱۵</sup>- Catalase activity

<sup>۱۶</sup>- Hydrolase activity, hydrolyzing N-glycosyl compounds

<sup>۱۷</sup>- rRNA N-glycosylase activity

<sup>۱۸</sup>- RNA glycosylase activity

<sup>۱۹</sup>- Phosphopantetheine binding

<sup>۲۰</sup>- Dioxygenase activity

<sup>۸</sup>- Catalytic activity

<sup>۹</sup>- Binding

<sup>۱۰</sup>- Antioxidant activity

<sup>۱۱</sup>- Enzyme regulator activity

<sup>۱۲</sup>- Molecular transducer activity

<sup>۱۳</sup>- Peroxidase activity

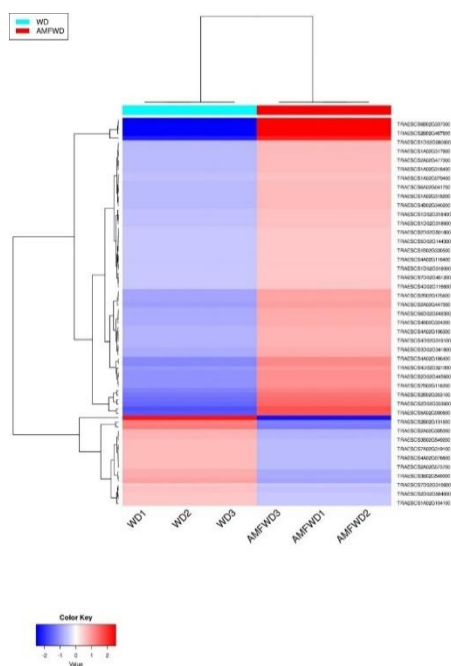
<sup>۱۴</sup>- Sequence-specific DNA binding transcription factor activity

جدول ۳. واژه‌های GO که به‌طور انحصاری توسط DEG‌های پاسخ‌دهنده به کم‌آبی در گیاهان تلقیح‌شده با میکوریزا غنی شده‌اند.

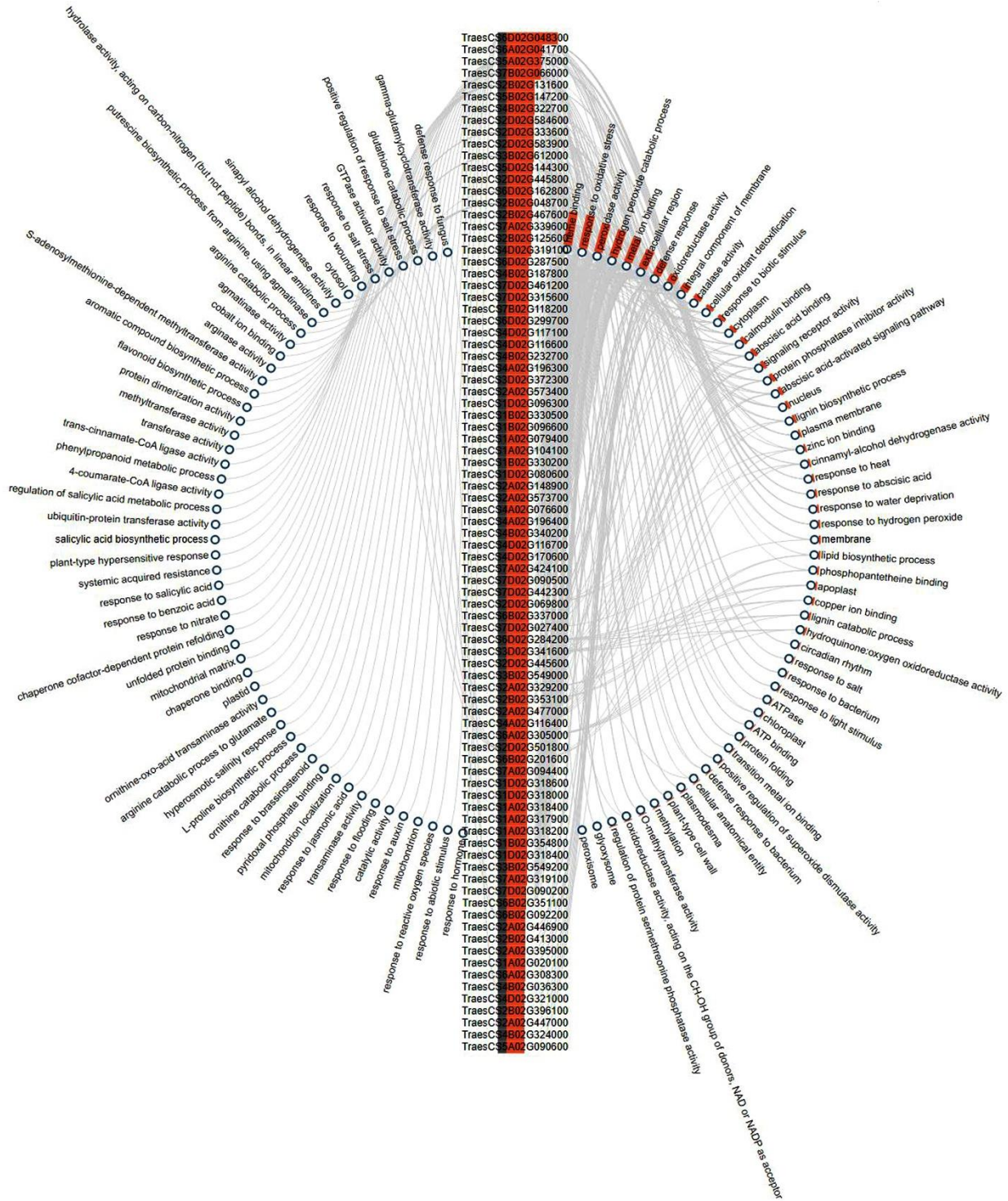
فرآیندهای زیستی	
GO Name	GO ID
پاسخ به گونه‌های اکسیژن واکنشگر	GO:0000302
تنظیم ترجمه	GO:0006417
ریتم سیرکادیان	GO:0007623
پاسخ به پرتو	GO:0009314
پاسخ به محرک نوری	GO:0009416
تنظیم پس از رونویسی بیان ژن	GO:0010608
تنظیم منفی بیان ژن	GO:0010629
تنظیم منفی ترجمه	GO:0017148
تنظیم منفی فرآیند متابولیسمی پروتئین سلولی	GO:0032269
تنظیم فرآیند متابولیسمی امید	GO:0034248
تنظیم منفی فرآیند متابولیسمی امید	GO:0034249
پاسخ به پراکسید هیدروژن	GO:0042542
فرآیند ریتمیک	GO:0048511
فرآیند تنظیم منفی متابولیسمی پروتئین	GO:0051248
تنظیم فرآیند بیوسنتزی ماکرومولکول سلولی	GO:2000112
تنظیم منفی فرآیند بیوسنتزی ماکرومولکول سلولی	GO:2000113

عملکرد مولکولی	
GO Name	GO ID
فعالیت کاتالاز	GO:0004096
فعالیت ۴-کومارات-CoA لیگاز	GO:0016207
فعالیت CoA-لیگاز	GO:0016405
فعالیت هیدرولاز، هیدرولیز ترکیبات N-گلیکوزیل	GO:0016799
فعالیت لیگاز	GO:0016874
فعالیت لیگاز، تشکیل پیوندهای کربن-گوگرد	GO:0016877
فعالیت اسید-تیول لیگاز	GO:0016878
فعالیت RNA گلیکوزیلاز	GO:0030597
N rRNA-گلیکوزیلاز	GO:0030598
اتصال به فسفوپانتئین	GO:0031177
فعالیت دی اکسیژناز	GO:0051213

جایگاه سلولی	
GO Name	GO ID
ماتریکس میتوکندریایی	GO:0005759
پراکسی زوم	GO:0005777
گلی اکسی زوم	GO:0009514



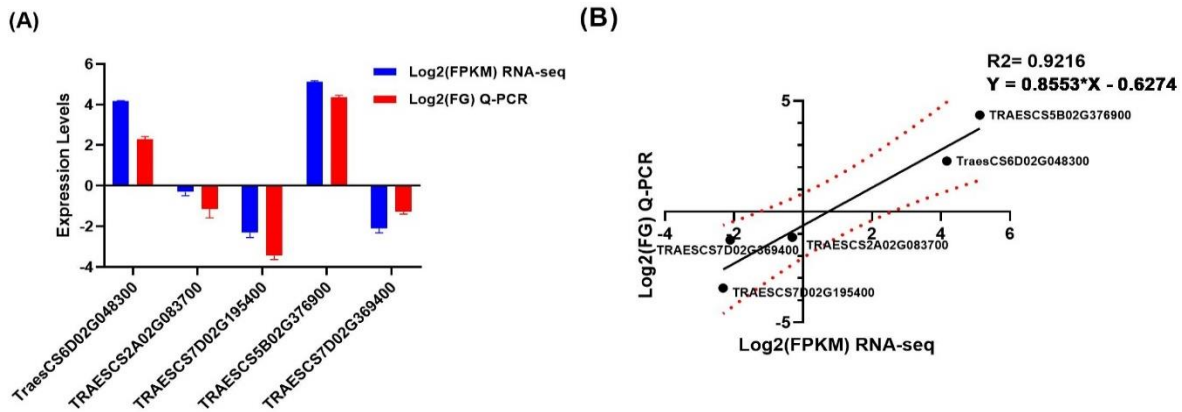
شکل ۵. تعداد و الگوی بیان DEGها در مقایسه گیاهان میکوریزایی با گیاهان غیرمیکوریزایی در شرایط کم آبی (AMF+/WD و AMF-/WD). مقیاس رنگ نشان دهنده مقدار FPKM است.



شکل ۶. آنالیز انتولوژی ژن. نقشه مفهومی WebGIVI توزیع واژگان GO زن‌های دارای بیان افتراقی در مقایسه گیاهان میکوریزایی با گیاهان غیرمیکوریزایی در شرایط کم‌آبی (AMF-/WD و AMF+/WD). نمودار میله‌ای روی هر گره (node) نشان دهنده فراوانی DEG‌های گره مذکور است.

که میزان بیان نسبی این ۵ ژن با نتایج RNA-Seq همبستگی دارد (شکل ۷). این نتایج به خوبی نتایج RNA-Seq را تایید می‌کند و نشان می‌دهد که تجزیه و تحلیل ژن‌های دارای بیان افتراقی قابل قبول است.

تایید داده‌های RNA-Seq به روش qRT-PCR به منظور تایید داده‌های RNA-Seq، ۵ ژن با بیان افتراقی در مقایسه (AMF+/WD و AMF-/WD) برای تجزیه و تحلیل qRT-PCR انتخاب شد. نتایج qRT-PCR نشان داد



شکل ۷. اعتبارسنجی بیان شماری از ژن‌های DEG به دو روش RNA-Seq و Realtime PCR. نتایج qRT-PCR ژن‌های انتخاب شده در تیمارهای مختلف تنش.

است. در مجموع ۲۳۵ ژن با بیان افتراقی در مقایسه گیاهان تلقیح‌شده با AMF و تلقیح‌نشده تحت تنش کم‌آبی (یعنی مقایسه آبیاری نرمال و تنش کم‌آبی) شناسایی شد. از میان آنها، تعداد ۷۰ ژن اختصاصی که بین تیمارها مشترک نبودند و در شرایط تنش کم‌آبی به صورت انحصاری توسط میکوریزا القاء شده‌اند شناسایی شد. به منظور درک مکانیزم مولکولی راه‌اندازی شده توسط AMF، این ژن‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی GO و KEGG نشان داد، این ژن‌ها به طور قابل توجهی مسیرهای مختلف و متعددی را غنی کردند که عمدتاً در تنظیم ردوکس سلولی، حمل و نقل سلولی، متابولیسم کربوهیدرات و فاکتورهای رونویسی نقش دارند. تنش کم‌آبی با افزایش سریع سطح ROS می‌تواند هموستاز ردوکس را مختل کند و منجر به آسیب اکسیداتیو به سلول‌های گیاهی شود. تحقیقات پیشین ثابت کرده‌اند که تلقیح AMF با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند POD، سوپراکسید دیسموتاز SOD و

میله‌های روی ستون‌ها نشان دهنده میانگین  $\pm$  خطای معیار برای دو تکرار تکنیکی درون هر کدام از سه تکرار زیستی می‌باشد. (B) نتایج همبستگی داده‌های qRT-PCR و داده‌های RNA-Seq برای ژن‌های انتخاب‌شده.

## بحث

تأثیر همزیستی میکوریزایی بر تغییر الگوی بیان ژن‌ها در بسیاری از گونه‌های گیاهی شناسایی و گزارش شده است (۱۸). مطالعات پیشین نشان می‌دهد، همزیستی میکوریزایی طیف وسیعی از فرآیندهای متابولیک از جمله مسیر بیوسنتز متابولیت‌های اولیه و ثانویه، انتقال یون، ترانسپانسی پیام و تنظیم رونویسی را در مراحل نمو گیاه تحت تاثیر قرار می‌دهد که بیانگر وابستگی شدید میزبان به این نوع همزیستی است (۱۹،۲۰). در این مطالعه بررسی داده‌های حاصل از تکنیک بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش کم‌آبی در ریشه گندم همراه

پرویلین و کربوهیدرات‌های محلول است که تغییرات نامتناسب با میزان تحمل گیاه به تنش کم‌آبی است. این افزایش محتوای پرویلین تحت شرایط تنش ممکن است در نتیجه القاء سنتز پرویلین و یا کاهش کاتابولیسم آن باشد (۲۶). فرآیند متابولیسم پرویلین و آرژنین از مهم‌ترین مسیرهای متابولیسم اسیدهای آمینه است، که به سنتز پرویلین منجر می‌شود. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در مسیر بیوسنتز پرویلین و آرژنین ژن‌های کدکننده OAT و AGR در گیاهان غیرمیکوریزیایی، در پاسخ به تنش کم‌آبی افزایش بیان معنی‌دار داشتند، اما در گیاهان میکوریزیایی، کاهش بیان داشتند. تنظیمات اسمزی در پاسخ به شرایط خشکی رخ می‌دهد که شامل املاح معدنی ( $K^+$ ،  $Ca^{2+}$ ،  $Mg^{2+}$  و غیره) و املاح آلی (پرویلین، قند، پروتئین، گلیسین و غیره) می‌شود (۲۷). همزیستی AMF می‌تواند در شرایط تنش خشکی از طریق تجمع بیشتر املاح توانایی گیاهان میزبان را برای حفظ تعادل اسمزی افزایش دهد (۲۸). به عنوان مثال، گزارش شده است که قارچ‌های AM وضعیت آب گیاهان سبب‌زمینی شیرین را از طریق تجمع قندهای محلول و پرویلین آزاد بهبود می‌بخشند (۲۹). در شرایط تنش کم‌آبی میزان تولید پرویلین در گیاه افزایش می‌یابد تا گیاه را قادر سازد با شرایط کم‌آبی سازگار شود، نتایج این تحقیق نشان داد همزیستی میکوریزیایی با کاهش اثرات سوء تنش در ریشه گندم نیازی به افزایش پرویلین ندارد، این نتایج هم‌راستا با یافته‌های Chun و همکاران (۲۰۱۸) است (۳۰). از شاخص‌ترین پاسخ‌های گیاهان تلقیح شده با میکوریزا در شرایط کم‌آبی کاهش بیان معنی‌دار ژن‌های مسیر بیوسنتز پرویلین و آرژنین است. در حالی که در گیاهان تلقیح نشده ژن‌های این مسیر در پاسخ به تنش کم‌آبی افزایش بیان نشان دادند. این نتایج نشان می‌دهد که میکوریزا با تعدیل اثر تنش و حفظ پتانسیل آبی سلول، نیاز به اسمولیت‌ها را کاهش می‌دهد. همچنین، در شرایط تنش کم‌آبی میکوریزا باعث افزایش بیان طیف گسترده‌ای از ژن‌های کدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ریشه گیاه گندم می‌شود که می‌تواند منجر به القاء پاسخ‌های مدیریت‌شده در ریشه گیاه و کاهش اثرات مخرب ROS شود. از سوی دیگر، افزایش بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز لیگنین در نتیجه حضور میکوریزا با تقویت دیواره سلولی از خروج آب از سیستم ریشه‌ای جلوگیری می‌کند که نوعی مکانیزم سازگاری

CAT تحمل کم‌آبی را در گیاهان میزبان افزایش می‌دهد (۲۱). نتایج این تحقیق نشان داد در گیاهان تحت تنش کم‌آبی با تلقیح AMF، ژن‌های کدکننده آنزیم‌های POD، SOD و CAT افزایش بیان قابل توجهی داشتند. در حالی که در گیاهان تلقیح‌نشده، ژن‌های کدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، مانند پراکسیداز POD و گلوکاتایون S-G-ترانسفراز (GST) در پاسخ به تنش کم‌آبی کاهش بیان معنی‌دار نشان دادند. نتایج بسیاری از تحقیقات بر کاهش/حذف ROS توسط میکوریزا تاکید دارند (۲۲). برخی مطالعات نشان می‌دهد که AMF سطح بیان برخی ژن‌های مرتبط با متابولیسم متابولیت‌های ثانویه مانند متابولیسم ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و لیگنین را افزایش می‌دهد، که در پاسخ‌های دفاعی، آنتی‌اکسیدانی و تحمل تنش کم‌آبی نقش دارند (۲۳). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که همزیستی میکوریزیایی در شرایط کم‌آبی، سطح بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های مسیر بیوسنتز سوبرین و لیگنین از جمله CAD، OMT، POD و لاکیز را افزایش می‌دهد که در توافق با مطالعات گذشته است (۲۴). همزیستی AMF می‌تواند از طریق القا بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز فنیل پروپانویید یا لیگنین بر اجزای دیواره سلولی گیاه میزبان تأثیر بگذارد. به نظر می‌رسد تلقیح AMF به احتمال مسیر متابولیتی گیاه را به سمت تقویت دیواره سلولی سوق می‌دهد. این تغییرات ساختاری ریشه‌ها، توسط AMF باعث افزایش هدایت هیدرولیکی ریشه و انتقال سلول به سلول آب می‌شود (۲۴، ۲۵). این نتایج نشان‌دهنده نقش کلیدی این ژن‌ها در سازوکارهای تحمل به کم‌آبی توسط AMF است. در مجموع، همزیستی میکوریزیایی با ریشه گندم ممکن است شبکه‌ای از تغییرات سیستماتیک را برای سازگاری با تنش کم‌آبی فراخوانی کند که به طور عمده شامل فرآیندهای متابولیک، تنظیم ردوکس سلولی، متابولیسم کربوهیدرات، تنظیم اسمزی، پاسخ به استرس اکسیداتیو، پاسخ به هورمون و رسوب لیگنین می‌شود. در شرایط کم‌آبی، استراتژی اولیه گیاه برای بهبود تنش اسمزی، تجمع اسمولیت‌های سازگار است که پتانسیل اسمزی را در سلول کاهش می‌دهد و در تثبیت ماکرومولکول‌ها و محافظت ساختارهای سلولی نقش دارد (۲۵). بنابراین از مهم‌ترین پاسخ‌های گیاهان در برابر تنش به خصوص تنش کم‌آبی، افزایش سطح ترکیبات اسمزی از جمله

با تنش کم آبی می باشد که توسط میکوریزا القاء می شود.

## نتیجه گیری

میکوریزا در مواجهه با تنش کم آبی از طریق تغییر در برنامه بیانی ژن های میزبان، بحران کم آبی را مدیریت می کند. تجزیه و تحلیل داده های RNA-Seq نشان داد ۷۰ ژن با بیان افتراقی منحصراً در ریشه گندم تلقیح شده با میکوریزا تحت تنش کم آبی القاء شد. انتولوژی ژن و تجزیه مسیر توانست ژن ها و برخی مسیرهای متابولیک کلیدی در پاسخ های سازگاری و تحمل به کم آبی گیاه را شناسایی کند. به نظر می رسد مکانیزم مولکولی راه اندازی شده توسط AMF با تنظیم مهار ROS، حفظ تعادل اسمزی و همچنین سنتز و شکل گیری دیواره سلولی در ریشه گندم تحمل به کم آبی را بهبود می بخشد. تحقیق حاضر در بردارنده اطلاعات

ارزشمندی در مورد الگوی ترانسکریپتوم ریشه گندم تلقیح شده با میکوریزا در واکنش به تنش WD می باشد. همچنین نتایج نشان داد که همزیستی میکوریزا با ریشه گندم نقش موثری در تحمل به کم آبی ایفا می کند. در این پژوهش مجموعه ای از ژن ها به عنوان ژن های کاندید کلیدی در افزایش مقاومت به کم آبی گندم گزارش شد، که با تحقیقات بیشتر در سطح مولکولی می توانند در انواع دستورزی های ژنتیکی مورد هدف قرار گیرند.

## سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات و آزمایشگاه تحقیقاتی ابن سینا، جهت فراهم نمودن تجهیزات و مواد لازم برای انجام این پژوهش را ابراز می دارند.

1. Franco AF, Marchioro VS, Montecelli TDN, Schuster I, Polo M, Souza LV, et al. CD 1303 - Short stature, high productive potential and industrial quality. *Crop Breed Appl Biotechnol.* 2018;18(1):123–5.
2. Hertel TW. Food Security Under Climate Change. *Nat Clim Chang.* 2016;6(1):10–3.
3. Rahimi-Moghaddam S, Deihimfard R, Azizi Kh, Roostaei M (2021) Characterizing spatial and temporal trends in drought patterns of rainfed wheat (*Triticum aestivum* L.) across various climatic conditions: a modelling approach. *Eur J Agron* 129:126333.
4. Scharwies JD, Dinneny JR. Water transport, perception, and response in plants. *J Plant Res.* 2019 May 11;132(3):311–24.
5. Janiak A, Kwasniewski M, Sowa M, Kuczyńska A, Mikołajczak K, Ogrodowicz P, et al. Insights into barley root transcriptome under mild drought stress with an emphasis on gene expression regulatory mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2019;20(24).
6. Fang Y, Du Y, Wang J, Wu A, Qiao S, Xu B, et al. Moderate drought stress affected root growth and grain yield in old, modern and newly released cultivars of winter wheat. *Front Plant Sci.* 2017;8(May):1–14.
7. Upadhyay P. Climate change and adaptation strategies: a study of agriculture and livelihood adaptation by farmers in Bardiya District, Nepal. *Adv Agric Environ Sci Open Access.* 2019 Mar 27;2(1):47–52.
8. Badri D V., Weir TL, van der Lelie D, Vivanco JM. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Curr Opin Biotechnol.* 2009;20(6):642–50.
9. Turlapati P V., Kim KW, Davin LB, Lewis NG. The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: Towards addressing the mystery of their gene function(s). *Planta.* 2011;233(3):439–70.
10. Tiwari P, Srivastava D, Chauhan AS, Indoliya Y, Singh PK, Tiwari S, et al. Root system architecture, physiological analysis and dynamic transcriptomics unravel the drought-responsive traits in rice genotypes. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021;207(August 2020):111252.
11. Mia MS, Liu H, Wang X, Zhang C, Yan G. Root transcriptome profiling of contrasting wheat genotypes provides an insight to their adaptive strategies to water deficit. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–11.
12. Wang H, Zhou P, Zhu W, Wang F. De novo Comparative Transcriptome Analysis of Genes Differentially Expressed in the Scion of Homografted and Heterografted Tomato Seedlings. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–12.
13. Moradi Tarnabi Z, Iranbakhsh A, Mehregan I, Ahmadvand R. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on gene expression of some cell wall and membrane elements of wheat (*Triticum aestivum* L.) under water deficit using transcriptome analysis. *Physiol Mol Biol Plants.* 2020;26(1):143–62.
14. Wu Q, Zhao G, Bai X, Zhao W, Xiang D, Wan Y, et al. Characterization of the transcriptional profiles in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) under PEG-mediated drought stress. *Electron J Biotechnol.* 2019;39:42–51.
15. Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods.* 2015;12(4):357–60.
16. Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc.* 2012;7(3):562–78.
17. Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M, Goff L, Rinn JL, Pachter L. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat Biotechnol.* 2013;31(1):46–53.
18. Handa Y, Nishide H, Takeda N, Suzuki Y, Kawaguchi M, Saito K. RNA-seq Transcriptional Profiling of an Arbuscular Mycorrhiza Provides Insights into Regulated and Coordinated Gene Expression in *Lotus japonicus* and *Rhizophagus irregularis*. *Plant Cell Physiol.* 2015;56(8):1490–511.
19. Sharma S, Anand G, Singh N, Kapoor R. Arbuscular Mycorrhiza Augments Arsenic Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum* L.) by Strengthening Antioxidant Defense System and Thiol Metabolism. *Front Plant Sci.* 2017;8(June):1–21.
20. Mathimaran N. Mycosphere Essay 17 Arbuscular mycorrhizal symbiosis and drought tolerance in

- crop plants. *Mycosphere*. 2017;8(3):361–76.
21. Ganugi P, Masoni A, Pietramellara G, Benedettelli S. A review of studies from the last twenty years on plant–arbuscular mycorrhizal fungi associations and their uses for wheat crops. *Agronomy*. 2019;9(12).
  22. Zou YN, Wu QS, Kuča K. Unravelling the role of arbuscular mycorrhizal fungi in mitigating the oxidative burst of plants under drought stress. *Plant Biol (Stuttg)*. 2021 May;23 Suppl 1:50-57.
  23. Hu Y, Xie W, Chen B. Arbuscular mycorrhiza improved drought tolerance of maize seedlings by altering photosystem II efficiency and the levels of key metabolites. *Chem Biol Technol Agric*. 2020 Dec 1;7(1):20.
  24. Oliveira TC, Cabral JSR, Santana LR, Tavares GG, Santos LDS, Paim TP, et al. The arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus* improves physiological tolerance to drought stress in soybean plants. *Sci Rep*. 2022 Dec 31;12(1):9044.
  25. Neysanian M, Iranbakhsh A, Ahmadvand R, Ardebili ZO, Ebadi M. Comparative efficacy of selenate and selenium nanoparticles for improving growth, productivity, fruit quality, and postharvest longevity through modifying nutrition, metabolism, and gene expression in tomato; potential benefits and risk assessment. *PLoS One*. 2020;15(12 December):1–17.
  26. Adamipour N, Khosh-Khui M, Salehi H, Razi H, Karami A, Moghadam A. Metabolic and genes expression analyses involved in proline metabolism of two rose species under drought stress. *Plant Physiol Biochem*. 2020;155(July):105–13.
  27. Ozturk, M., Unal, B. T., Garcia-Caparrros, P., Khursheed, A., Gul, A., and Hasanuzzaman, M. (2021). Osmoregulation and its actions during the drought stress in plants. *Physiol. Plant*. 172, 1321–1335.
  28. Zou, Y. N., Zhang, F., Srivastava, A. K., Wu, Q. S., and Kuča, K. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi regulate polyamine homeostasis in roots of trifoliolate orange for improved adaptation to soil moisture deficit stress. *Front. Plant Sci*. 11:600792
  29. Yooyongwech S, Samphumphuang T, Tisarum R, Theerawitaya C, Cha-um S. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) improved water deficit tolerance in two different sweet potato genotypes involves osmotic adjustments via soluble sugar and free proline. *Scientia Horticulturae*. 2016 Jan 26;198: 107-17.
  30. Chun SC, Paramasivan M, Chandrasekaran M. Proline Accumulation Influenced by Osmotic Stress in Arbuscular Mycorrhizal Symbiotic Plants. *Front Microbiol*. 2018;9(October):1–13.