



شناسایی ژن *gsh303* رمزگذار پروتئین نامزد کارکرد تغییرگری در برهمکنش *Ascochyta rabiei* با گیاه نخود

مرضیه حسنی^۱، فرهاد شکوهی فر^{۲*} و مجتبی ممرآبادی^۳

- ۱- دانشجوی دکتری گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
- ۲- *نویسنده مسوول: استادیار، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران (shokouhifar@um.ac.ir)
- ۳- دانشیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۵

چکیده

پروتئین‌های تغییرگر نقش مهمی در برهمکنش میان قارچ‌های بیمارگر و گیاه میزبان ایفا می‌کنند. شناسایی و بررسی عملکرد پروتئین‌های تغییرگر برای درک ساز و کار بیماری‌زایی، برهمکنش و تعیین راه‌بردهای به‌نژادی برای تولید ارقام مقاوم بسیار مهم است. بیماری برق‌زدگی ناشی از قارچ *Ascochyta rabiei* یکی از مخرب‌ترین و گسترده‌ترین عامل خسارت‌زا در زراعت نخود در بیشتر مناطق است. شناسایی ژن‌های تغییرگر در این قارچ بر اساس داده‌های ژنومی و بیانی ژن‌های قارچ *A. rabiei* در شرایط شرایط رشدی مختلف می‌تواند در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی گیاه نخود مورد توجه قرار گیرد. مطالعه حاضر با بررسی شاخص‌های عمومی پروتئین‌های تغییرگر و نحوه القاء‌پذیری آنها توانسته است ژن *gsh303* رمزگذار پروتئین نامزد کارکرد تغییرگری در بیماری‌زایی قارچ *A. rabiei* را شناسایی نماید و حضور آن را در ژنوم پاتوتیپ مختلف (PI, PIII و PVI) قارچ *A. rabiei* رشد یافته در شرایط آزمایشگاهی تایید نماید و توالی آن‌ها مورد مقایسه قرار دهد. در سطح ترانوشت نیز بیان این ژن در شرایط رشد پاتوتیپ‌های PI, PIII و PVI از قارچ *A. rabiei* در محیط کشت و همچنین در شرایط برهمکنش با لاین‌های نخود مقاوم (MCC133) و حساس (ILC1929) در زمان ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی مورد بررسی قرار گرفت. ژن‌های حیاتی *argapdh* و *abct* به ترتیب مربوط به قارچ *A. rabiei* و گیاه نخود به عنوان مرجع در نظر گرفته شد. این نتایج نشان داد ترانوشت ژن *gsh303* در شرایط رشد در محیط کشت قابل ردیابی نبود ولی در شرایط برهمکنش با گیاه ردیابی شد. در مجموع می‌توان انتظار داشت پروتئین رمزگذاری‌شده توسط این ژن در شرایط بیماری‌زایی قارچ روی گیاه به شکل یک تغییرگر عمل کند. به عنوان یک نامزد، نقش تغییرگری این پروتئین باید در مطالعات تکمیلی مورد بررسی قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: پاتوتیپ‌های *Ascochyta rabiei* ردیابی ژن‌های تغییرگر، عناصر تنظیمی بیان ژن، لاین‌های نخود حساس و مقاوم

دبیر تخصصی: دکتر رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا

Citation: Hasani, M., Shokouhifar, F. & Mamarabadi, M. (2023). Detection of the *gsh303* Gene Encoding a Candidate Protein with Effector Function during the Interaction between *Ascochyta rabiei* and Chickpea. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 46(2), 87-106. <https://10.22055/ppr.2023.44137.1699>.

مقدمه

حبوبات منبع غنی از پروتئین، فیبر، کربوهیدرات و مواد معدنی به شمار می آید. جدا از ارزش غذایی، حبوبات با دارا بودن توانایی منحصر به فرد در تثبیت زیستی نیتروژن اتمسفر، منجر به افزایش حاصل خیزی خاک می شوند (Kim & Chen, 2019). بیماری برقزدگی یا بلایت آسکوکیتایی نخود (*Ascochyta blight*) که توسط قارچ *Phoma rabiei* (Pass.) Labr. (اکنون *Phoma rabiei* (Pass.) Khune ex Gruyter) ایجاد می شود، یکی از عوامل محدود کننده اصلی کشت حبوبات به ویژه در فصول سرد سال بوده و باعث افت شدید عملکرد این گیاه می شود (Taylor & Ford, 2007, Kim & Chen, 2019). قارچ مذکور مرده پرور^۱ بوده و باعث مرگ سلول های میزبان شده و در بافت مرده رشد می کند و خسارات قابل توجهی را به محصول نخود وارد می کند (Singh et al., 2022). تلاش های زیادی برای به نژادی ژنتیکی ارقام مقاوم نخود با استفاده از جایگاه های کمی برای ایجاد مقاومت به بیماری برقزدگی انجام شده است (Kumar et al., 2018).

در فرآیند بیماری زایی در گیاهان میزبان، بسیاری از بیمارگرهای قارچی مولکول های کوچک متنوعی از جمله متابولیت ها یا پروتئین های ثانویه ای را تولید و ترشح می کنند. به طور معمول سامانه ای ایمنی گیاه می تواند الگوهای مولکولی مرتبط با ریزسازواره ها را تشخیص داده و پاسخ های دفاعی را القا کند. در این بین پروتئین هایی از بیمارگر^۲ که قادرند در فرآیندهای مختلف میزبان مداخله کرده و از طریق ممانعت و یا مهار پاسخ های ایمنی میزبان و یا عوامل دفاعی، رشد و نمو بیمارگر را در میزبان تسهیل و تسریع کنند، به عنوان پروتئین های "تغییرگر"^۳ شناخته می شوند (Rep, 2005; Shokouhifar et al., 2016; Lo Presti et al., 2017). پروتئین های تغییرگر به طور معمول در فضای آپوپلاستی میزبان ترشح شده و یا به سیتوپلاسم سلول های آن منتقل می شوند و با تغییر در فرآیندهای معمول در گیاه سبب وارد شدن خسارت و در نهایت بروز علائم می شوند

(Stergiopoulos & de Wit, 2009). پیشرفت های اخیر بیوانفورماتیکی و مطالعات تجربی، کشف ژن های بیماری زا در بیمارگرهای مرده پرور، از جمله تغییرگرهای پروتئینی، HSTs و تغییرگرهای srNA نشان می دهد که در این بیمارگرها از طیف وسیعی از سازوکارهای پیچیده برای رشد و نمو در گیاه استفاده می کنند که سبب بیماری زایی در گیاه میزبان می شوند (Shao et al., 2021). یکی از کارکردهای پروتئین های تغییرگر در بیمارگرهای مرده پرور از طریق برهمکنش با ژن های عامل حساسیت در میزبان است (Faris & Friesen, 2020). بیمارگرها در فرآیند تکاملی خود می توانند با تغییر ژن های تغییرگر، از تحریک و القای پاسخ های دفاعی میزبان جلوگیری کنند (Wang et al., 2014; Li et al., 2021). اخیراً گزارش شده است که در تعدادی از بیمارگرهای مرده پرور پروتئین های تغییرگر قادرند فرآیند مرگ برنامه ریزی شده سلولی^۴ را در میزبان القاء نمایند (Li et al., 2019; Wei et al., 2020). پروتئین تغییرگر ARPEC25 در قارچ *A. rabiei* شناسایی شده است که قادر است با انتقال به داخل سلول میزبان به درون هسته وارد شود و با اثر بر مسیر تولید لیگنین در میزبان باعث کاهش تولید سطوح لیگنین و در نتیجه کاهش مقاومت گیاه نسبت به این بیمارگر شود (Singh et al., 2023). شناخت ژن های تغییرگر و نحوه عملکرد آنها در برهمکنش بیمارگر و گیاه میزبان می تواند در طراحی برنامه های به نژادی برای دستیابی به مقاومت هدف دار مؤثر باشد (Vleeshouwers & Oliver, 2015). روش های مختلفی برای شناسایی ژن های تغییرگر در برهمکنش میان بیمارگر و میزبان به کار گرفته شده است (Kamoun, 2006; Stergiopoulos & de Wit, 2009; Verma et al., 2016). بررسی پروفایل بیانی ژن ها و پروتئین ها در مراحل مختلف زمانی برهمکنش بیمارگر و میزبان و واکاوی کارکرد آنها در مراحل آزمایشگاهی یکی از عمومی ترین روش ها برای شناسایی پروتئین های تغییرگر بوده است (Stergiopoulos & de Wit, 2009; De Wit et al., 2009).

3- Effector

4- Programmed cell death (PCD)

1- Necrotrophic

2- Pathogen

ردیابی عوامل ترانوسی راهی برای شناسایی ژن‌های بیماری‌زا را فراهم می‌کند (John et al., 2021). مطالعه انجام شده روی الگوی بیانی ۱۳ عامل ترانوسی در *A. rabiei* در شرایط رشد روی محیط کشت در مقایسه با شرایط برهمکنش با گیاه نشان داده است که بیان عامل ترانوسی bZIP^۴، با اختلاف معنی‌داری در شرایط برهمکنش با گیاه القاء شده است (Verma et al., 2017). مطالعه انجام شده روی قارچ مرده-پرور *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. نشان داده است که عامل ترانوسی bZIP به عنوان یک تنظیم‌کننده در فرآیندهای زیستی قارچ از جمله پاسخ به تنش‌های غیرزیستی و بیماری‌زایی نقش کلیدی ایفا می‌نماید (Gai et al., 2022). بر این اساس انتظار می‌رود این عامل ترانوسی بتواند در بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی در قارچ *A. rabiei* نقش القائی داشته باشد. واکاوی توالی بالادست ژن‌های رمزگذار^۵ پروتئین‌های ترشحی در قارچ *A. rabiei* نشان داده است که نگاره‌های تنظیمی مانند توالی wtGTAGTAAkr می‌توانند به عنوان جایگاه اتصال عامل ترانوسی bZIP عمل کنند (Verma et al., 2017). لذا انتظار می‌رود حضور این بن‌مایه در توالی بالادست ژن‌های ترشحی به عنوان یکی دیگر از شاخص‌های تأیید کننده پروتئین‌های تغییرگر نامزد مورد توجه قرار گیرد.

در این مطالعه در بخش اول، با استفاده از واکاوی‌های بیوانفورماتیکی، شناسایی و معرفی ژن‌های تغییرگر بر اساس داده‌های ژنومی موجود در بانک ژن^۶ NCBI و انتخاب آنها بر اساس شاخص‌های معمول مورد توجه در شناسایی پروتئین‌های تغییرگر و علاوه بر آن بر اساس حضور بن‌مایه‌های خاص در توالی تنظیمی، ژن‌های نامزد مورد بررسی قرار می‌گیرد. در بخش دوم حضور ژن تغییرگر نامزد در پاتوتیپ‌های مختلف قارچ *A. rabiei* در سطح ژنوم و ترانوش در شرایط رشد روی محیط کشت و برهمکنش با گیاه میزبان ردیابی شده و مورد مقایسه قرار می‌گیرد.

al., 2009; Fondevilla et al., 2015; Shokouhifar et al., 2016). در مطالعات ژنومی یکی از اصلی‌ترین رویکردها برای شناسایی و مطالعه تغییرگرها، بررسی کل پروتئین‌های بیمارگرها توسط برنامه‌های بیوانفورماتیکی مختلف است که به غربال‌سازی پروتئین‌های ترشحی کمک می‌کند (Sperschneider et al., 2015; Carreón-Anguiano et al., 2020). محققین با این روش‌ها تعدادی ژن شناسایی و معرفی نمودند که در شرایط تنش اُکسایشی بیان شده و در بیماری‌زایی قارچ *A. rabiei* نیز نقش مهمی را ایفا می‌کنند (Maurya et al., 2020). نقش انتقالات مولکولی داخلی در بیماری‌زایی این قارچ و نقش پروتئین ARF-BAR به عنوان حس‌گر انحنای غشاء در زمان ترشح تغییرگر مشخص شده است (Sinha et al., 2021). ویژگی‌های عمومی مانند پروتئین‌های ترشحی با اندازه کوچک (150-400aa) و غنی از سیستئین‌های برای نامزد نمودن پروتئین‌های تغییرگر مورد توجه قرار می‌گیرد (Sperschneider et al., 2015). بر اساس این ویژگی‌ها ابزارهای مختلفی برای واکاوی داده‌های زیستی و نامزد کردن پروتئین‌های تغییرگر در شرایط درون رایانه‌ای ارائه شده است (Gibriel et al., 2016; Sonah et al., 2018; Jones et al., 2018). ابزارهای تحت شبکه برای شناسایی پروتئین‌های ترشحی دارای نشانک پپتید^۱ (کلاسیک) و پروتئین ترشحی فاقد نشانک پپتید (غیرکلاسیک) ارائه شده است (Emanuelsson et al., 2007). موانع مهمی از جمله شباهت اندک و یا عدم وجود شباهت در نگاره‌ها یا بن‌مایه‌ها^۲ در پروتئین‌های تغییرگر شناخته شده، مشاهده نشده است (Rozano et al., 2023). بر این اساس ترکیب روش‌های مختلف برای افزایش راندمان پیش‌بینی ژن‌های تغییرگر ضروری است. توجه به الگوی بیان ژن‌ها و نقش عوامل ترانوسی^۳ و برهمکنش آنها با جایگاه تنظیمی متناظر آنها در بالادست ژن‌ها، می‌تواند به عنوان یکی از شاخص‌ها در شناسایی ژن‌های تغییرگر مورد توجه قرار گیرد. مطالعات نشان داده است که، شناسایی و

4- Basic Leucine Zipper (bZIP)
5- Coding genes
6- GenBank

1- Signal Peptide
2- Motifs
3- Transcription factors

<http://clavius.bc.edu/clotelab/DiANNA>

(NA)، براساس شیوه‌نامه موجود در وبسایت انجام شد.

پیش‌بینی پروتئین‌های تغییرگر به کمک ابزار EffectorP

پروتئین‌های تغییرگر با استفاده از ابزار EffectorP 3.0 (<https://effectorp.csiro.au/>) (Sperschneider & Dodds, 2021) (براساس شیوه‌نامه موجود در وبسایت) از میان پروتئین‌های گزینش شده در مراحل قبل انتخاب شدند. این ابزار بر اساس مشخصه‌هایی همچون وزن مولکولی، تعداد بار خالص و ویژگی محتوای اسید آمینه‌های سیستین، سرین و تریپتوفان، توالی‌های اسید آمینه را مورد واکاوی قرار می‌دهد.

پیش‌بینی حضور و عدم حضور زنجیره پلی‌پپتیدهای کارکردی در پروتئین‌های تغییرگر نامزد

پروتئین‌های منتخب توسط EffectorP، توالی‌های مورد نظر برای حضور و عدم حضور زنجیره پلی‌پپتیدهای کارکردی در پروتئین‌های تغییرگر نامزد، با استفاده از ابزارهای موجود در پایگاه داده pfam (<http://pfam.xfam.org/>) (براساس شیوه‌نامه موجود در وبسایت) مورد بررسی قرار گرفتند.

واکاوی عناصر سیس تنظیمی^۳ تغییرگر نامزد

یک کیلو باز از بالادست ژن نامزد از پایگاه داده NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) استخراج شد. از پایگاه داده MEME (<https://meme-suite.org/meme/>) برای پیش‌بینی نگاره‌های حفاظت شده در طول توالی‌های مد نظر با گزینه‌های Tomtom v 5.4.1 از ابزار (<https://meme-suite.org/meme/tools/tomtom>)

برای شناسایی عناصر تنظیمی سیس شناخته شده براساس پایگاه داده JASPER CORE 2020 با $E\text{-value} >$ 5 و میکروارگانیزم *Saccharomycetaceae* به صورت پیش‌فرض خود ابزار استفاده گردید (Fornes et al., 2020). برای واکاوی‌های تکمیلی و پیش‌بینی عملکردهای

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری داده‌های زیستی قارچ *A. rabiei*

به منظور انتخاب ژن تغییرگر، توالی کل پروتئین مربوط به قارچ *A. rabiei* (Verma et al., 2017) از پایگاه داده NCBI براساس نسخه ژنی با رس‌شماره JYNV00000000.1 در فرمت CSV استحصال شد و از نرم‌افزار ماکروسافت اکسل برای بررسی‌های بعدی استفاده گردید. سپس به کمک ابزارهای بیوانفورماتیکی مختلف (ر.ک. ادامه مطلب)، پروتئین‌های تغییرگر نامزد در میان آن‌ها شناسایی و انتخاب شدند.

شناسایی پروتئین‌های سبک ترشچی

از میان توالی‌های پروتئینی بازیابی شده، پروتئین‌هایی با طول کمتر از ۲۵۰ آمینو اسید انتخاب شدند، سپس پروتئین‌ها ترشچی به وسیله ابزار TargetP2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TargetP-2.0>) و پروتئین‌های ترشچی کلاسیک با استفاده از ابزار تحت شبکه SignalP4. (<https://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) براساس شیوه‌نامه موجود در وبسایت مورد بررسی قرار گرفتند، همچنین برای تمایز پروتئین‌های ترشچی غیر کلاسیک از ابزار SecretomeP1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SecretomeP-1.0>) براساس شیوه‌نامه موجود در وبسایت استفاده شد.

شناسایی پروتئین‌های فاقد زنجیره پلی‌پپتیدی (دامانه^۲) غشائی

برای شناسایی و حذف پروتئین‌های دارای زنجیره پلی‌پپتیدی غشائی از بین پروتئین‌های ترشچی، از ابزار تحت شبکه TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) براساس شیوه‌نامه موجود در وبسایت استفاده شد.

پیش‌بینی پروتئین‌های غنی از آمینواسید سیستین

وجود توالی‌های غنی از سیستین و پیش‌بینی قابلیت تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی، با استفاده از ابزار تحت شبکه

3- Cis-regulatory elements

1- Accession number

2- Domain

نانوگرم) و ۳ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. برنامه دمایی ۳ دقیقه در 94°C و ۳۵ چرخه با 45°C ثانیه 93°C ، 40°C ثانیه 60°C و 90°C دقیقه 72°C و مرحله فزون سازی نهایی ۵ دقیقه 72°C بود و با استفاده از دستگاه PCR (BOECO Thermal) (Cycler TC-TE, Germany) فزون سازی صورت گرفت.

استخراج RNA و ساخت cDNA و ردیابی ژن در سطح ترانویست در شرایط آزمایشگاهی

استخراج RNA با استفاده از کیت Column RNA Isolation kit (شرکت دنا زیست، ایران) از مجموعه ریشه های قارچی انجام و کمیّت و کیفیت RNA استخراجی با الکتروفورز روی ژل آگارز بررسی گردید. برای ساخت cDNA از کیت ساخت cDNA (پارس توس، ایران)، آغازگرهای عمومی Oligo (dt)18 و آنزیم ترانویسی معکوس Reverse (RT)RevertAidTM M-MuLV Transcriptase استفاده و طبق شیوه نامه شرکت سازنده انجام گرفت. cDNA ساخته شده به عنوان الگو در واکنش زنجیره ای پلیمرز، برای فزون سازی ژن هدف با آغازگرهای اختصاصی PSh303-F/R (جدول ۱) با همان برنامه و شیوه نامه اشاره شده در بالا مورد استفاده قرار گرفت.

کشت و آماده سازی مواد گیاهی و سوسپانسیون قارچی برای آلوده سازی نمونه های گیاهی

بذور مربوط به دو لاین نخود شامل MCC133 و ILC1929 که سطح مقاومت آنها در مقابل پاتوتیپ های *A. rabiei* در شرایط مزرعه، گلخانه و آزمایشگاه در مطالعات گذشته تعیین شده بود (Shokouhifar et al., 2003; Ramezani Khozestani et al., 2006; et al., 2023; Firouzmand et al., 2023)، به ترتیب به عنوان نمونه مقاوم و حساس در برابر قارچ *A. rabiei*، از بانک بذر پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد، ایران تهیه شدند. سه پاتوتیپ PI، PIII و PVI قارچ *A. rabiei* به ترتیب با شماره مرجع های (FUM 1001/ASR001، FUM 1003/ASR003 و FUM 1006/ASR006) که قدرت بیماری زایی آنها قبلاً گزارش شده بود (Shokouhifar et

احتمالی هر نگاره ابزار GOMO (<https://meme-suite.org/meme/tools/gomo>) به کار گرفته شد.

طراحی آغازگر برای ژن تغییرگر نامزد

توالی ژن *gsh303* با رس شمار ST47_g5489) از میان داده های رونوشتام^۱ گزارش شده (Verma et al., 2016) از پایگاه داده NCBI به عنوان یک ژن تغییرگر انتخاب و بازیابی گردید. برای طراحی آغازگرهای اختصاصی از نرم افزار SnapGene استفاده شد. آغازگرهای طراحی شده با نام PSh303-F با توالی (5'-ATG AAG TTC ACC ACC GCT GCC-3' و آغازگر PSh303-R با توالی (5'-CGA CGG GCT TAA GAG CTG GTA TAC A -3' توسط شرکت سیناکلون، ایران، ساخته شد. همچنین از آغازگرهای PSh19F/R (Zangene et al., 2022) متعلق به توالی ژن خانه بان *argapdh* به عنوان ژن مرجع با رس شمار (EKO05-007398) استفاده گردید.

کشت پاتوتیپ های مختلف قارچ *Ascochyta rabiei* و استخراج DNA

پاتوتیپ های *A. rabiei* از بانک میکروارگانسیم دانشگاه فردوسی مشهد (WDCM 1207)، ایران تهیه شد و سه پاتوتیپ PI، PIII و PVI که در مطالعات قبلی طبقه بندی شده بودند (Shokouhifar et al., 2003)، برای ردیابی ژن تغییرگر نامزد انتخاب گردیدند. پاتوتیپ های قارچی برای استخراج DNA در محیط مایع سیب زمینی - دکستروز (PDB) تازه در دمای $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ، به مدت دو هفته کشت گردید. پس از رشد قارچ، استخراج DNA با روش CTAB انجام شد (Murray & Thompson, 1980).

ردیابی و فزون سازی توالی ژن هدف در ژنوم *A. rabiei* در هر سه پاتوتیپ در شرایط درون شیشه ای^۳

واکنش زنجیره ای پلیمرز^۴ در حجم ۱۰ میکرولیتر با محتویات هر واکنش شامل ۵ میکرولیتر MasterMix2x (شرکت سیناکلون، ایران)، ۵ پیکومول از هر آغازگر اختصاصی PSh303-F/R، ۱ میکرولیتر DNA ژنومی (50~

ردیابی ژن *gsh303* در سطح ژنوم و ترانوشت در شرایط برهمکنش

برای ردیابی ژن *gsh303* در شرایط برهمکنش، واکنش فزون‌سازی برای ژن *gsh303* با آغازگرهای اختصاصی (PSh303F/R) برای هر دو نمونه DNA و cDNA مرتبط با شرایط برهمکنش انجام گرفت.

نتایج

واکاوی^۲ نرم افزاری داده‌های زیستی و شناسایی ژن تغییر‌گر نامزد

واکاوی توالی کامل ژنوم قارچ *A. rabiei* و توالی بیانی پیش‌بینی شده در این قارچ، نشان داد (شکل ۱) از میان کل پروتئین‌های قابل پیش‌بینی در این قارچ تعداد ۲۳۴۷ پروتئین طولی کمتر از ۲۵۰ آمینواسید دارا می‌باشند (شکل ۱- مرحله ۲). از آنجا که اکثر تغییر‌گرهای قارچی گزارش شده در بیمارگرهای مختلف از جمله بیمارگرهای مرده‌پرور اندازه کوچکی دارند، (Liu et al., 2012; Lu & Edwards, 2018; Rodriguez-Moreno et al., 2016) ادامه واکاوی‌ها روی این مجموعه پروتئینی متمرکز شد. نتایج واکاوی این مجموعه با ابزارهای SecretomeP1.0 و SignalP4.1 نشان داد در میان آن‌ها ۱۴۱۳ پروتئین ترشحی کلاسیک و غیر کلاسیک وجود دارد. بررسی مسیر ترشحی این پروتئین‌ها با ابزار TargetP2.0 نشان داد که در میان آن‌ها در مجموع ۳۳۰ پروتئین در میتوکندری و کلروپلاست وارد شده و مابقی در سیتوپلاسم سلول میزبان ترشح می‌شوند (شکل ۱- مرحله ۳). اما این مسیر، پروتئین‌هایی را که دارای زنجیره پلی‌پپتیدی گذرنده از غشاء بوده و ترشحی هستند را حذف نمی‌کند. واکاوی این مجموعه در ابزار تحت شبکه TMHMM به شناسایی ۱۲۸۲ پروتئین ترشحی فاقد زنجیره پلی‌پپتیدی گذرنده از غشاء منتج شد که در این بین ۲۲۴ پروتئین کلاسیک و ۱۰۵۸ پروتئین متعلق به غیر کلاسیک‌ها بودند (شکل ۱- مرحله ۴). در این مطالعه پروتئین‌های با میزان سیستئین بالا نیز پیش‌بینی گردیدند که از میان آن‌ها ۳۴۴ پروتئین ترشحی دارای میزان سیستئین (≥ 4) و دارای

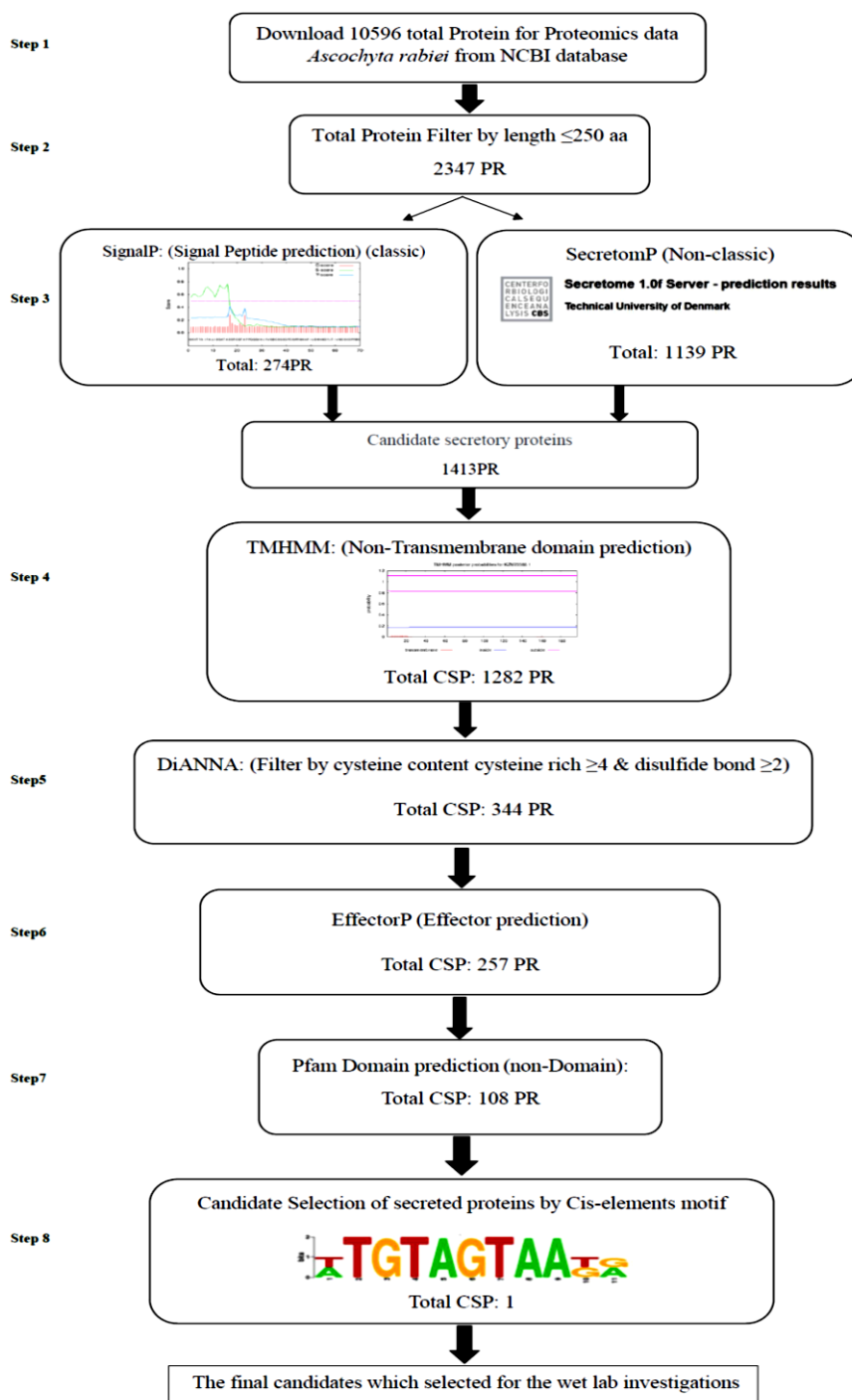
(al., 2003). از بانک میکروارگانیزم‌های پژوهش‌شده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. مراحل آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی، شامل کشت و آماده‌سازی نمونه برگ‌گی از دو لاین MCC133 و ILC1929، و مایه تلقیح از سه پاتوتیپ PVI، PIII، PI، قارچ *A. rabiei* به روش آزمون بیماری‌زایی درون شیشه (Ramezani Khozestani et al., 2023; Firouzmand et al., 2023) انجام گرفت. در آزمایشات نمونه‌های برگ‌گی از هر ژنوتیپ به عنوان کنترل تنها با آب مایه‌زنی شدند.

تأیید حضور قارچ در نمونه‌ها بعد از آلوده‌سازی در سطح ژنوم و ترانوشت در شرایط برهمکنش

نمونه برداری برگ‌های آلوده شده، بعد از ۹۶ ساعت انجام و پس از انجماد در نیتروژن مایع به 80°C - برای انجام سایر آزمایش‌ها منتقل و نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه‌ها به روش CTAB (Murray & Thompson, 1980) و استخراج RNA با استفاده از کیت RNA Isolation kit (شرکت دنا زیست، ایران) انجام گرفت. کیفیت و کمیّت DNA و RNA استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت. ساخت cDNA با استفاده از کیت ساخت cDNA (شرکت پارس توس، ایران) انجام گرفت. ردیابی قارچ‌ها در سطح ژنوم و ترانوشت و تأیید ساخت cDNA نمونه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (PSh19-F (5'- CCT TCA -3' و PSh19-R (3'- TCG AGC CCC ACT AC -5' (GCC TCC CTT CAA GTG AGCC -3' طراحی شده برای ژن *argapdh* در داده‌های ژنومی قارچ *A. rabiei* انجام شد. همچنین از آغازگرهای اختصاصی (PABCT-F (5'- CCT CAA ATC -3' و PABCT-R (3'- TTG TTG GGG TGTC -3' (Reddy et al., 2016) مربوط به ژن خانه‌بان *abct* گیاه نخود با رس‌شمار (LOC101505577) برای تأیید ساخت cDNA در گیاهان شاهد استفاده گردید. واکنش فزون‌سازی برای هر دو آغازگر در حجم ۱۰ میکرولیتر با شرایط قبلی صورت گرفت.

بین آنها ۲۵۷ پروتئین تغییرگر پیش‌بینی شدند (شکل ۱- مرحله ۶). واکاوی این پروتئین‌ها با استفاده از پایگاه داده Pfam نشان داد که در این بین ۱۰۸ پروتئین فاقد نگراره‌های پلی‌پپتیدی کارکردی شناسایی شده تا زمان انجام این مطالعه می‌باشند (شکل ۱- مرحله ۷).

بیش از دو پیوند دی‌سولفیدی بودند، که ۱۱۳ توالی متعلق به پروتئین‌های کلاسیک و ۲۳۱ توالی متعلق به پروتئین‌های غیر کلاسیک بودند (شکل ۱- مرحله ۵). همچنین به منظور انتخاب تغییرگرهای نهایی تعداد ۳۴۴ پروتئین نامزد با استفاده از ابزار EffectorP مورد بررسی قرار گرفتند؛ که از



شکل ۱- فرآیند شناسایی ژن‌های تغییرگر بالقوه در میان پروتئین‌های قابل بیان توسط *Ascochyta rabiei*

Figure 1. Identification process for potential effector genes among proteins that can be expressed by *Ascochyta rabiei*. PR: Protein, CSP: Candidate Secreted Proteins

factore می‌باشند. نتایج بررسی GOMO نشان داد این نگاره‌ها از طریق ارتباط با عوامل ترانوشت می‌توانند در فرآیندهای زیستی مهم فیزیولوژیک، ساخت اسیدهای آمینه و انتقال پروتئین‌ها نقش ایفاء نمایند (جدول ۱).

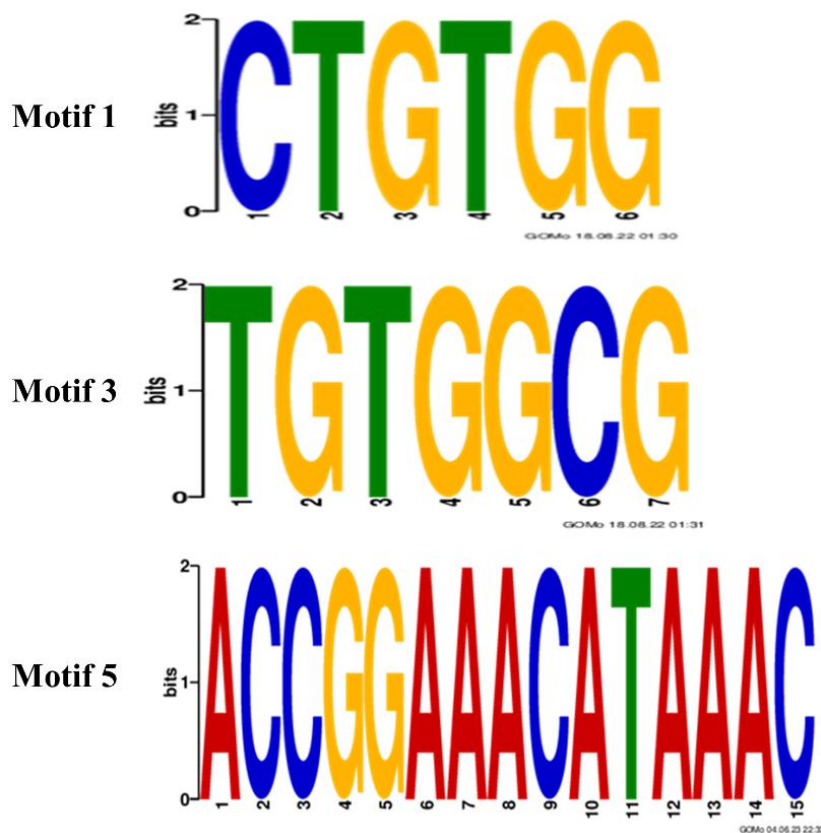
ردیابی ژن تغییر‌گر نامزد در سه پاتوتیپ قارچ بیماری‌زای *A. rabiei* در شرایط درون‌شیشه‌ای

توالی ژن تغییر‌گر نامزد فرضی، در داده‌های ژنومی قارچ *A. rabiei* در پایگاه NCBI با رس‌شمار (ST47_g5489) در حد فاصل بازهای ۸۴۴۳۰ - ۸۳۸۴۰ قرار گرفته است. طول این ژن ۵۹۱ جفت باز بوده و دارای یک اگزون و فاقد اینترون است. طول توالی پروتئینی رمزگذار توسط این ژن ۱۹۶ اسید آمینه بوده که با رس‌شمار KZM23388 در بانک ژن NCBI ثبت شده و تاکنون هیچ گونه عملکردی برای آن مشخص نشده است. این ژن پس از انتخاب تحت نام *gsh303* نامگذاری شد. آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای آن به نام PSH303-F/R نامگذاری شد و قطعه‌ای به طول ۵۹۹ جفت باز قابل تکثیر بود (شکل ۳- A).

هرچند عوامل ترانویسی متعددی می‌توانند در مسیر القای پروتئین‌های تغییر‌گر نقش ایفاء نمایند ولی بر اساس داده‌های بیانی مربوط به ترانویس bZIP در این مطالعه صرفاً روی پروتئین‌های ترشحی تمرکز شد که در توالی پیش‌بر بالادست توالی رمزگذار خود حامل عناصر تنظیمی جایگاه این ترانویس باشند و بر این اساس پروتئین‌های حامل این نگاره شناسایی شدند (شکل ۱- مرحله ۸). در میان پروتئین‌های دارای نگاره مرتبط با bZIP پروتئینی به نام GSH303 برای بررسی‌های آزمایشگاهی تکمیلی انتخاب شد.

بررسی عناصر سیس تنظیمی در توالی پیش‌بر ژن *gsh303*

در نتیجه بررسی توالی هزار جفت باز بالادست نواحی تنظیمی ژن *gsh303* به کمک ابزار MEME سه نگاره مهم با طول‌های شش، هفت و بیست نوکلئوتیدی شناسایی شدند (شکل ۲). این نگاره‌ها جایگاه‌های متناظر برای اتصال عوامل ترانوشت Tryptophan, C2H2 zinc finger factors, cluster factors, Basic leucine zipper (bZIP) می‌باشند.



شکل ۲: توالی نگاره‌های تنظیمی شناسایی شده در منطقه توالی رمزگذار بالادست ژن *gsh303*

Figure 2: Logos of cis-regulatory elements detected in upstream sequence encoding of *GSH303*.

استریومیکروسکوپ علائم بیماری به صورت بسیار محدود روی برگچه‌های گیاه مقاوم مایه‌زنی شده با هر سه پاتوتیپ مشاهده شد (شکل ۴-B). علائم ناشی از مایه‌زنی با پاتوتیپ PIII در مقایسه با دو پاتوتیپ PI و PVI به طور مشاهده‌ای روی گیاهان مقاوم و حساس بیشتر بود. در مجموع با توجه به بروز علائم می‌توان صحت انجام مراحل مایه‌زنی و نمونه برداری از برگ‌های آلوده را برای انجام مراحل مولکولی تایید نمود.

پس از استخراج RNA از نمونه‌های شاهد و آلوده، تایید کیفیت و صحت cdNA ساخته شده از آغازگرهای اختصاصی ژن *abct* خود به عنوان ژن مرجع انجام شد. مطابق با نمای شماتیک ژن (شکل ۵-A) انتظار می‌رفت فزونه‌های به طول‌های ۱۸۷۸ و ۱۳۵ جفت باز به ترتیب در سطح ژنوم و ترانسکریپتوم به دست آمده از گیاهان نخود مورد بررسی تکثیر شوند که در الگوی الکتروفورزی نمونه‌ها قطعاتی در محدوده مورد انتظار مشاهده شد (شکل ۵-B). همانطور که در شکل مشاهده می‌شود فزونه‌هایی اختصاصی در محدوده اندازه‌ی ۲ کیلوبازی در الگوی الکتروفورزی مشاهده می‌شود که با اندازه قابل تکثیر از DNA ژنومی کاملاً انطباق دارد. با توجه به حضور یک اینترون در حدود ۱۷۰۰ جفت باز در میان اگزون هفت و هشت ژن *abct* انتظار می‌رفت در صورت تکثیر اختصاصی قطعات هدف از روی cdNA تنها فزونه‌ای در حد فاصل ۱۰۰ و ۲۵۰ جفت باز مشاهده شود. نتایج الکتروفورز در شکل ۵-B به خوبی این حضور این فزونه اختصاصی را نشان می‌دهد.

نتیجه ردیابی حضور ژن *gsh303* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در پاتوتیپ‌های (PI، PIII و PVI) مربوط به قارچ *A. rabiei* توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز منجر به فزون‌سازی قطعه‌ای به طول ۵۹۹ جفت باز گردید (شکل ۳-C). توالی ژن *argapdh* به عنوان مرجع در سطح DNA و cdNA مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PSh19-F/R قطعاتی به طول ۳۳۱ جفت باز در سطح DNA و ۲۳۹ جفت باز در سطح cdNA مورد انتظار بود (شکل ۳-B)، که نتایج انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز اختصاصی در هر سه پاتوتیپ به تکثیر نوارهایی با اندازه‌های مورد انتظار منتج شد (شکل ۳-C). ردیابی این ژن در سطح ترانوشنت نشان داد که این ژن برخلاف ژن خانه‌بان *gapdh* در هر سه پاتوتیپ در شرایط درون‌شیشه‌ای فاقد بیان است.

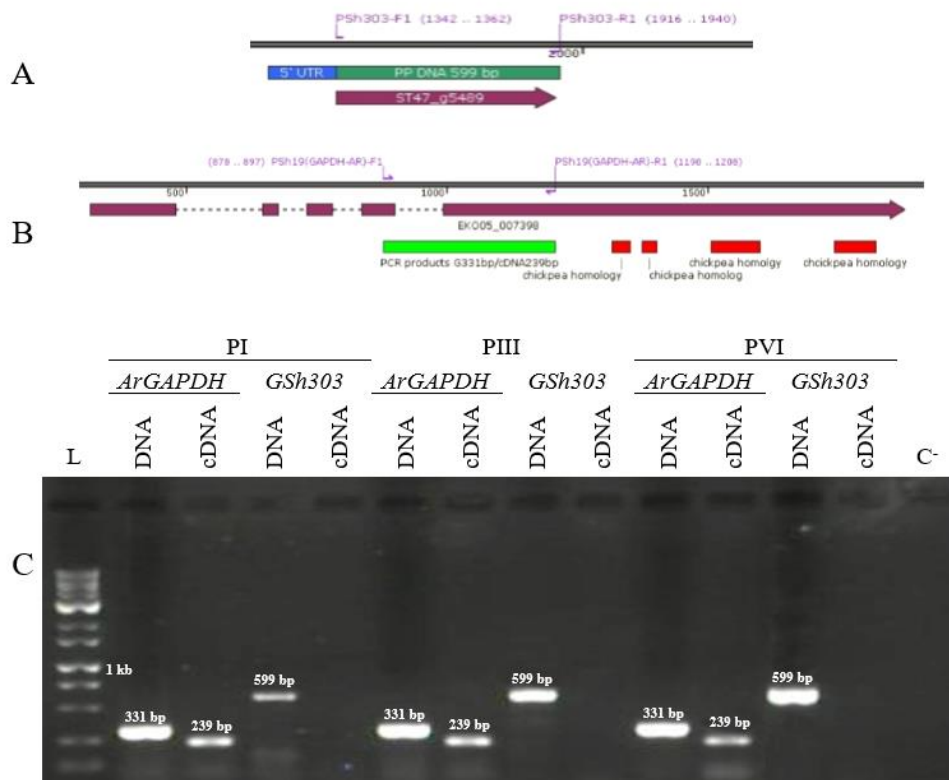
برهمکنش گیاهان مقاوم و حساس با پاتوتیپ‌های *A. rabiei*

علائم بیماری برق‌زدگی روی برگ‌های جداشده گیاهان ILC1929 (حساس) از زمان ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی با پاتوتیپ‌های پاتوتیپ PI، PIII، PVI قارچ *A. rabiei* در شرایط آزمایشگاه بروز یافت (شکل ۴-A). تفاوت علائم بروز یافته روی برگ‌های آلوده در مقایسه با نمونه شاهد (مایه‌زنی شده با آب) کاملاً مشهود بود. علائم ظاهری روی برگ‌های جداشده مربوط به گیاه MCC133 (مقاوم) مایه‌زنی شده با پاتوتیپ PI در مقایسه با نمونه شاهد (مایه‌زنی شده با آب) مشاهده نشد (شکل ۴-A). با بررسی دقیق‌تر برگ‌ها زیر

جدول ۱- پیش‌بینی نگاره‌های محافظت شده عناصر تنظیمی سیس در نواحی پیش‌بر ژن تغییرگر نامزد

Table 1. Prediction of conserved motifs of cis-regulatory elements in the promoter regions of candidate effector genes

Name	E-value	Overlap	JASPAR	CLASS	Significant GO term
Motif 1	1.48E-01	6	MA0332.1	Basic leucine zipper factors (bZIP)	BP methionine biosynthetic process BP translational elongation MF pyridoxal phosphate binding BP cysteine biosynthetic process MF steroid binding
Motif 3	4.73e+00	7	MA0334.1	C2H2 zinc finger factors	BP methionine biosynthetic process BP translational elongation BP cellular amino acid derivative biosynthetic process BP inorganic anion transport BP cysteine biosynthetic process
Motif 5	7.37e+00	15	MA1943.1	Tryptophan cluster factors	Homeo domain factors



شکل ۳- (A) نمای شماتیک ژن *gsh303* که موقعیت آغازگرها و طول فزون را براساس توالی ژن *gsh303* در سطح DNA نشان می‌دهد. (B) نمای شماتیک ژن *gapdh* که موقعیت آغازگرها و طول فزونه را براساس توالی ژن *gapdh* در دو سطح DNA و cDNA نشان می‌دهد. (C) الگوی الکتروفورزی ژن‌های *gsh303* و *gapdh* (شاهد مثبت) با دو نمونه DNA و cDNA استخراج شده از پاتوتیپ‌های (PI، PIII و PVI) مربوط به قارچ *Ascochyta rabiei* رشد یافته در شرایط محیط کشت مایع، C⁻: شاهد منفی، که حاوی مخلوط PCR (مستر میکس + آغازگرهای F/R + آب) بدون DNA هدف، L: 1Kb DNA Ladder.

Figure 3. (A) Schematic representation of *gsh303* gene showing the position of primers and the length of the amplified fragment based on the *gsh303* gene sequence on the DNA level. (B) Schematic representation of *gapdh* gene showing the position of primers and the length of the amplified fragment based on the sequence of *gapdh* gene in both DNA and cDNA levels. (C) Electrophoretic pattern of the *gsh303* and *gapdh* (positive control) genes with two DNA and cDNA samples related to three pathotypes (PI, PIII and PVI) of *Ascochyta rabiei*. C⁻: negative control, which contains the PCR mixture (master mix + F/R primers + water) without target DNA, L: 1Kb DNA Ladder.

(ILC1929) شاهد و مایه‌زنی شده با سه پاتوتیپ

مشاهده شد (شکل ۵- D).

ردیابی قارچ در cDNA ساخته شده از گیاهان مقاوم (MCC133) آلوده شده به هر سه پاتوتیپ نیز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PSh19-F/R به طور کاملاً اختصاصی انجام شد (شکل ۵- C). از آنجا که عدم حضور آلودگی DNA در cDNA ساخته شده از گیاهان MCC133 و ILC1929 آلوده شده به هر سه پاتوتیپ تأیید شده است، لذا می‌توان انتظار داشت که فزونه‌های حاضر در الگوی الکتروفورزی صرفاً به cDNA ساخته شده از RNA بیان شده توسط قارچ مربوط می‌باشد (شکل ۵- C و D).

حضور قارچ در گیاهان مربوط به ژنوتیپ‌های مقاوم

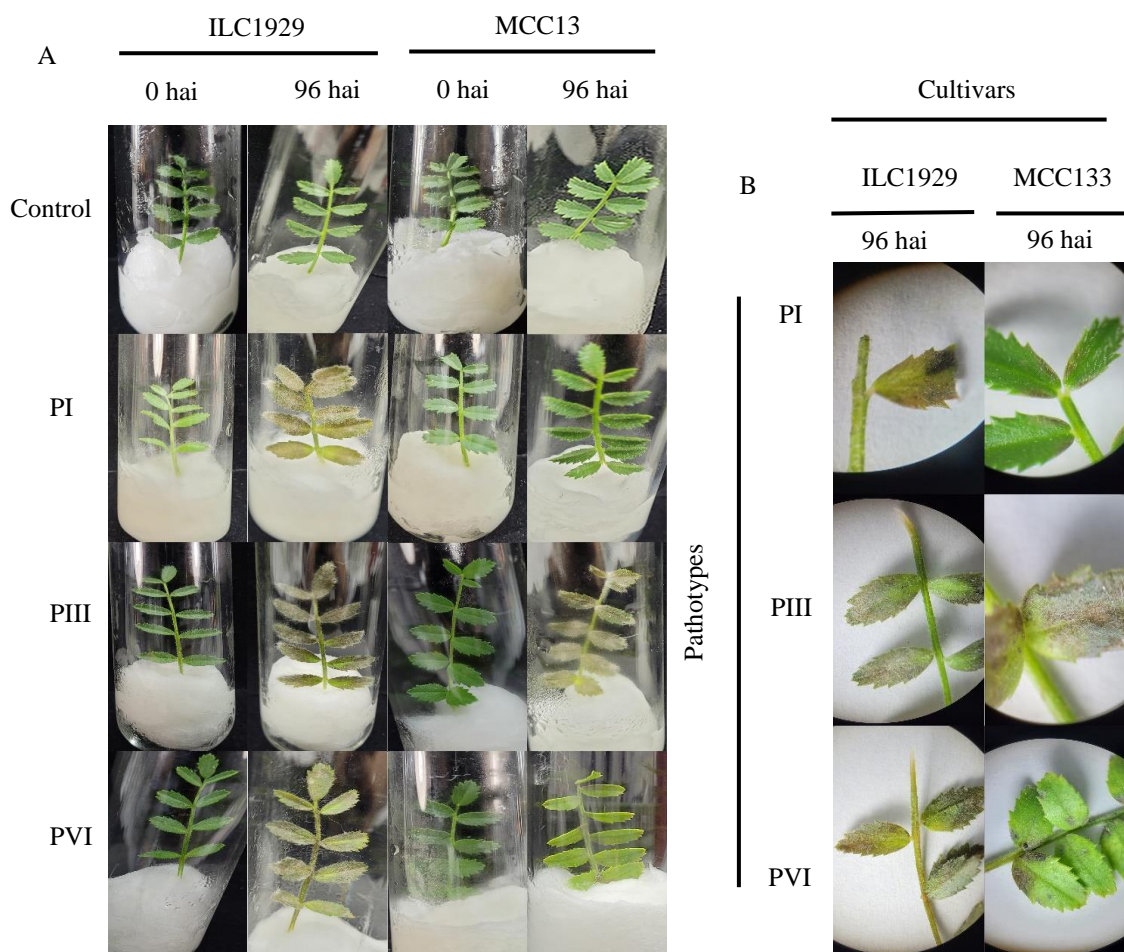
(MCC133) و حساس (ILC1929)، ۹۶ ساعت پس از

مایه‌زنی علاوه بر روش آزمون بیماری‌زایی درون شیشه‌ای (شکل ۴)، با روش مولکولی با استفاده از ردیابی ژن خانه‌بان *argapdh* مربوط به *A. rabiei* نیز تأیید شد (شکل ۵- C). در سطح DNA گیاهان آلوده شده به پاتوتیپ‌های PI، PIII و PVI فزونه‌ای به اندازه ۳۳۱ جفت باز در الگوی الکتروفورزی مشاهده شد که در گیاه مربوط به ژنوتیپ MCC133 مایه‌زنی شده با آب (MUCK treated) قابل مشاهده نبود (شکل ۵- C). نتایج مشابهی نیز در گیاهان مربوط به لاین حساس

تمایز فزونه های تکثیر شده اختصاصی به وسیله آغازگرهای PSh303-F/R در محدوده مورد انتظار (۵۹۹ جفت باز) در الگوی الکتروفورزی محصول PCR مربوط به DNA استخراج شده از گیاهان مقاوم و حساس ۹۶ ساعت پس از مایه زنی با پاتوتیپ PI مشاهده شد (شکل ۶-۱&۲+ C). در گیاهان مقاوم و حساس مایه زنی شده با آب (Muck treated) فزونه مربوط به ژن *gsh303* مشاهده نشد (شکل ۶-۱&۲ M). همچنین عدم ردیابی ژن *gsh303* در سطح ترانوشت در پاتوتیپ های قارچ *A. rabiei* رشد یافته در سطح محیط کشت نیز تأیید واقعی بودن این ژن را ضروری ساخته بود. با توجه به عدم حضور توالی اینترونی در ژن *gsh303* بر اساس داده های ژنومی استحصال شده در بانک ژن، امکان قابل ردیابی است (شکل ۶).

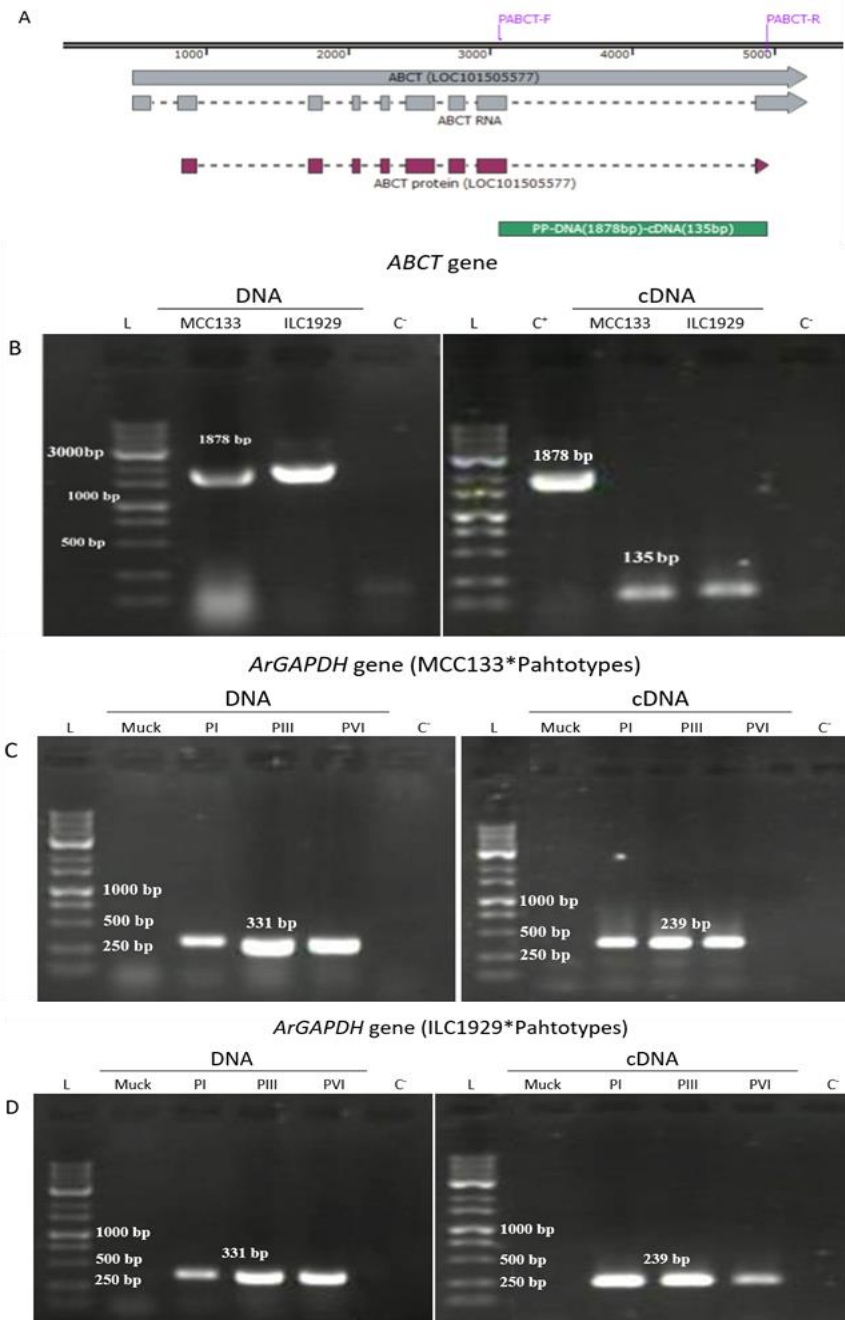
تمایز فزونه های تکثیر شده اختصاصی از cDNA ساخته شده وجود نداشت. لذا تأیید ردیابی این ژن در سطح ترانوشت تنها با تأیید کیفیت و خالص بودن cDNA ساخته شده از نمونه ها ممکن بود که در مرحله قبل با بررسی الگوی الکتروفورزی نتایج PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *argapdh* در cDNA ساخته شده از گیاهان آلوده به پاتوتیپ های مورد مطالعه تأیید شده بود (شکل ۵- C، D).

نتایج الگوی الکتروفورزی محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز نشان داد فزونه اختصاصی در محدوده مورد انتظار (۵۹۹ جفت باز) در گیاهان مقاوم (MCC133) در زمان ۹۶ ساعت پس از مایه زنی شده با پاتوتیپ های PI، PIII و PVI قابل ردیابی است (شکل ۶).



شکل ۴- (A) بیماری زایی پاتوتیپ های PI، PIII و PVI قارچ *Ascochyta rabiei* روی ارقام MCC133 (مقاوم) و ILC1929 (حساس) نخود به بیماری برق زدگی. (B) تصویر علائم آلودگی ایجاد شده توسط پاتوتیپ های PI، PIII و PVI قارچ *A. rabiei* در دو رقم حساس و مقاوم. 0 hai: بلافاصله پس از تلقیح، 96: 96 ساعت بعد از مایه زنی.

Figure 4. (A) Pathogenicity of *Ascochyta rabiei* pathotypes I, III, and VI on resistant (MCC133) and susceptible (ILC1929) chickpea cultivars to *Ascochyta* blight. (B) Images of infection symptoms caused by *A. rabiei* pathotypes I, III, and VI in the two cultivars. The images were taken at 0 (0 hai) and 96 (96 hai) hours after inoculation.



شکل ۵- (A) نماى شماتيك ژن *abct* خود با رس شمار (LOC101505577) و موقعيت آغازگرهاى اختصاصى PABCT-F/R (Reddy et al., 2016) و طول فزونه‌هاى قابل تکثير از توالى DNA و cDNA، (B) الگوى الکتروفورزى ژن *abct* براى تأييد حضور DNA ژنومى گياهان نخود شاهد و تأييد ساخت cDNA گياهان ارقام مقاوم (MCC133) و حساس (ILC1929) به بيمارى برق زدگى (C) الگوى الکتروفورزى ژن *gapdh* به عنوان شاهد مثبت براى تأييد حضور DNA ژنومى پاتوتیپ‌هاى PI، PIII و PVI قارچ *Ascochyta rabiei* هنگام برهمكش با ارقام مقاوم و حساس نخود (D) الگوى الکتروفورزى ژن *gapdh* به عنوان شاهد مثبت براى تأييد ساخت cDNA، از RNA استخراجى از گياهان نخود مايه‌زنى شده با سه پاتوتیپ قارچ. C: شاهد منفى، كه حاوى مخلوط PCR (مستر ميكس + آغازگرهاى F/R + آب) بدون DNA هدف مى‌باشد.

Figure 5. A) Electrophoretic pattern of the *abct* gene confirming the presence of genomic DNA in control chickpea plants, and cDNA synthesis in control resistant (MCC133) and susceptible (ILC1929) chickpea cultivars to *Ascochyta* blight. B) Electrophoretic pattern of the *gapdh* gene as a positive control for confirming the presence of genomic DNA of *Ascochyta rabiei* pathotypes I, III, and VI during interactions with resistant and susceptible chickpea cultivars. C) Electrophoretic pattern of the *gapdh* gene as a positive control to confirm the cDNA synthesis and RNA extraction from chickpea plants inoculated with three pathotypes of *A. rabiei*. C: negative control, which contains the PCR mixture (master mix + F/R primers + water) without target DNA.

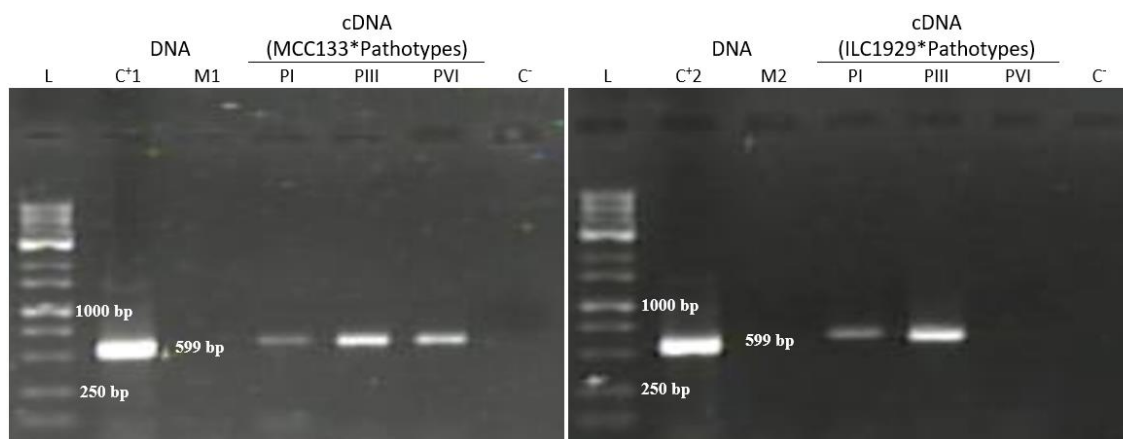
& de Wit, 2009; De Wit et al., 2009; Fondevilla et al., 2015; Shokouhifar et al., 2016، واکاوی داده‌های زیستی به وسیله ابزار بیوانفورماتیکی بر اساس ویژگی‌های ساختاری و نگاره‌های کارکردی آن‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (Carreón-Anguiano et al., 2020). با این حال حجم بالای پروتئین‌های واجد شرایط و محدودیت‌های آزمایشگاهی برای تأیید کارکرد آن‌ها، سبب شد تا در مطالعه حاضر از روش واکاوی داده‌های زیستی و بررسی حضور جایگاه تنظیمی متناظر با عوامل ترانویسی در توالی‌های تنظیمی پروتئین‌ها، نسبت به نامزد نمودن تعداد محدودی از پروتئین‌های نامزد برای انجام واکاوی‌های زیستی آزمایشگاهی در قارچ مرده‌پرور *A. rabiei* استفاده شود.

نتایج واکاوی‌های بیوانفورماتیکی برای شناسایی ژن‌های تغییرگر براساس شاخص‌های عمومی در این مطالعه توانست در میان بالغ بر ۱۰ هزار پروتئین فرضی قابل ترانویسی توسط ژنوم قارچ *A. rabiei* در حدود ۱۲۸۲ پروتئین ترش‌شی شناسایی نماید، در حالی که در مطالعات گذشته ۷۵۸ پروتئین ترش‌شی شناسایی شده بود (Verma et al., 2016).

این نتیجه واقعی بودن و القایی بودن بیان ژن *gsh303* را در شرایط برهمکنش قارچ *A. rabiei* با گیاه تأیید نمود. الگوی الکتروفورزی محصول PCR در سطح ترانوشست مربوط به گیاهان حساس (ILC1929) در زمان ۹۶ ساعت پس از آلودگی با پاتوتیپ‌های PI و PIII فزونه اختصاصی مشاهده شد ولی در نمونه‌های مربوط به پاتوتیپ PVI این فزونه مشاهده نشد (شکل ۶).

بحث

پروتئین‌های تغییرگر توسط سویه‌های خاصی از بیمارگر معمولاً در شرایط برهمکنش با گیاه میزبان تولید می‌شوند و قادرند در فرآیندهای مختلف میزبان مداخله کرده، از طریق ممانعت و یا مهار پاسخ‌های ایمنی و یا عوامل دفاعی، سبب تسهیل و تسریع رشد و نمو بیمارگر در میزبان شوند (Rep, 2005; Shokouhifar et al., 2016; Lo Presti et al., 2019; Neu & Debener, 2017). برای مطالعه این پروتئین‌ها روش‌های مختلفی از جمله بررسی پروفایل بیانی ژن‌ها و پروتئین‌ها در مراحل مختلف زمانی برهمکنش بیمارگر و میزبان و واکاوی کارکرد آنها (Stergiopoulos



شکل ۶- الگوی الکتروفورزی ژن *gsh303* با نمونه‌های cDNA گیاهان نخود مقاوم (MCC133) و حساس (ILC1929) به بیماری برق‌زدگی، مایه‌زنی شده با پاتوتیپ‌های (PI، PIII و PVI) مربوط به قارچ بیماری‌زای *Ascochyta rabiei* C+1&2: به ترتیب DNA استخراج شده از گیاهان MCC133 و ILC1929 آلوده شده به پاتوتیپ PI به عنوان کنترل امکان ردیابی ژن در محتوی DNA استخراج شده، M 1&2: به ترتیب DNA استخراج شده از گیاهان MCC133 و ILC1929 مایه‌زنی شده با آب، C: شاهد منفی، که حاوی مخلوط PCR (مستر میکس + آغازگرهای F/R + آب) بدون DNA هدف می‌باشد.

Figure 6. The electrophoresis pattern of the *gsh303* gene using cDNA samples from resistant (MCC133) and susceptible (ILC1929) chickpea cultivars inoculated with pathotypes PI, PIII, and PVI of *Ascochyta rabiei*. Lanes C +1& C+2: respectively, DNA extracted from MCC133 and ILC1929 chickpea plants inoculated by PI pathotype as a control for the possibility of gene tracking in the extracted DNA content, M1& M2: respectively, DNA extracted from MCC133 and ILC1929 chickpea plants inoculated with water: C- negative control, which contains PCR mixture (master mix + F/R primers + water) without target DNA.

ای در ژن‌های تغییرگر در قارچ‌های مرده‌پرور می‌تواند در نتیجه برهمکنش جدایه‌ها با ژنوتیپ‌های مختلف میزبان نقش ایفا نماید (Anderson et al., 2017; Wei et al., 2020). معمولاً ژن‌های تغییرگر در شرایط برهمکنش با میزبان بیان القایی نشان می‌دهند و در شرایط رشد در محیط کشت بیان آن‌ها بسیار ناچیز است (Singh et al., 2023). بر این اساس، عدم امکان ردیابی این ژن در سطح ترانوشست سه پاتوتیپ رشد یافته در محیط کشت قابل انتظار بود. مشاهده ترانوشست ژن خانه‌بان *argapdh* در نمونه‌ها کیفیت و عدم آلودگی cDNA ساخته شده را تایید نمود.

نتایج بررسی ردیابی ژن *gsh303* در شرایط برهمکنش با پاتوتیپ به خوبی با الگوی مورد انتظار انطباق نشان داد. در این مرحله ابتدا کیفیت cDNA ساخته شده با استفاده از ژن‌های مرجع نخود *abct* و *A. rabiei* (*argapdh*) در سطح ژنومی و ترانوشتی گیاهان نخود مقاوم و حساس مورد تأیید قرار گرفت. ردیابی ژن خانه‌بان قارچ در نمونه‌های آلوده تأیید کننده انجام مراحل مایه‌زنی بود. همچنین کیفیت cDNA ساخته شده نیز با مشاهده نوارهای اختصاصی در اندازه مورد انتظار تأیید شد. تأیید امکان ردیابی قارچ در گیاهان آلوده در سطح ترانوشست نشان می‌دهد که کمیت RNA استخراج شده از گیاهان آلوده شده به مقداری بوده است که این امکان را مهیا نموده است. این نتایج نشان داد ژن *gsh303* در هر سه پاتوتیپ در شرایط برهمکنش با گیاه و ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی قابل ردیابی است. این نتایج واقعی بودن این ژن و القایی بودن آن را در شرایط برهمکنش در مقایسه با شرایط رشد روی محیط کشت، تأیید نمود.

بررسی الگوی بیان عامل ترانویسی bZIP در شرایط برهمکنش قارچ *A. rabiei* با گیاه نخود روند القایی از حدود ۱۲ ساعت پس مایه‌زنی را نشان داده است (Verma et al., 2016). ارتباط الگوی بیان عوامل ترانویسی با بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی در شرایط برهمکنش بین قارچ *A. rabiei* و گیاهان نخود نیز گزارش شده است (Fondevilla et al., 2015). لذا انتظار می‌رود بیان ژن *gsh303* نیز به دلیل حضور نگاره‌های مرتبط با این ترانوشست با الگویی مشابه ولی با زمان تاخیری القاء شود. تأثیر عوامل

در مطالعه حاضر با استفاده از ابزار effectorP تعداد محدودی از پروتئین‌ها حائز ویژگی‌های لازم برای پروتئین‌های تغییرگر تشخیص داده شدند. به نظر می‌رسد از آنجا که این ابزار بر اساس داده‌های مربوط به پروتئین‌های تغییرگر شناخته شده برای قارچ‌های با الگوی زیستی زنده‌پرور عمل می‌کند، احتمالاً می‌توان در میان پروتئین‌های حذف شده در این مرحله نیز، در مطالعات تکمیلی پروتئین‌های تغییرگر را شناسایی نمود. گزارش‌های که اخیراً روی ارزیابی پروتئین‌های تغییرگر مربوط به قارچ‌های مرده‌پرور *Rhizoctonia solani* Kühn و *A. rabiei* با استفاده از ابزار effectorP انجام شده است، نشان داده است که این پروتئین‌ها با استفاده از این ابزار حائز شرایط دانسته نشده‌اند، درحالی‌که کارکرد تغییرگری آنها در القای مرگ سلولی در میزبان تأیید شده است (Li et al., 2019; Wei et al., 2020; Shokouhifar et al., 2023). بر این اساس در آزمایش‌های تکمیلی می‌توان پروتئین‌ها حذف شده توسط این شاخص را مجدد مورد بررسی قرار داد. در مطالعه حاضر با اعمال تمام فیلترها در مجموع حدود ۱۰۸ پروتئین حائز شرایط شناخته شدند که از میان آن‌ها تنها پنج پروتئین در توالی پیش‌بر خود واجد نگاره‌های تنظیمی مرتبط با عامل ترانوشست bZIP بودند. استفاده از نگاره‌های تنظیمی در نواحی پیش‌بر پروتئین‌های ترش‌چی در شناسایی دیگر ژن‌های بیماری‌زایی گزارش شده است (Markstein et al., 2002; Zhang et al., 2012; Seidl et al., 2005). در میان پروتئین‌های حائز شرایط یک پروتئین GSH303 به عنوان یکی از نامزدها برای مطالعات آزمایشگاهی انتخاب شد.

مراحل آزمایشگاهی برای تأیید واقعی بودن ژن *gsh303* در سطح DNA ژنومی سه پاتوتیپ قارچ *A. rabiei* رشد یافته روی محیط کشت نشان داد توالی پیش‌بینی شده در هر سه پاتوتیپ قابل ردیابی است. نتایج توالی‌یابی قطعات تکثیر شده تأیید نمود که در جدایه‌های هر سه پاتوتیپ توالی این ژن، محافظت شده است و بین آن‌ها هیچ تفاوتی وجود ندارد. لذا نمی‌توان انتظار داشت که تفاوت در توالی این ژن بتواند در اختلاف قدرت بیماری‌زایی پاتوتیپ‌های قارچ *A. rabiei* مؤثر باشد. همان‌گونه که گزارش شده است جهش‌های نقطه

مطالعه تأیید نمود که آغازگرهای اختصاصی PSh19-F/R بر اساس توالی ژن *argapdh* با دقت زیادی قادرند حضور قارچ *A. rabiei* را در گیاهان آلوده در سطح DNA و cDNA به طور کاملاً اختصاصی ردیابی نمایند.

نتیجه گیری

در مجموع طبق نتایج این مطالعه ژن *gsh303* بر اساس شاخص های ارزیابی شده توسط واکاوای های بیوانفورماتیکی به عنوان یک ژن تغییرگر نامزد شد و در بررسی آزمایشگاهی روی پاتوتیپ های قارچ *A. rabiei* در سطح ژنومی ردیابی شد، اما اختلافی بین توالی های این ژن در سه پاتوتیپ مشاهده نگردد. بیان این ژن در شرایط رشد پاتوتیپ های روی محیط کشت قابل ردیابی نبود ولی بیان آن در شرایط برهمکنش هر سه پاتوتیپ با ژنوتیپ مقاوم MCC133 مورد تأیید قرار گرفت. براساس نتایج مطالعه حاضر عدم امکان ردیابی ترانوشت این ژن در شرایط برهمکنش میان پاتوتیپ PVI و گیاهان مربوط به لاین ILC1929 (حساس به برق زدگی) می تواند به عنوان یک فرضیه به دلیل تفاوت در عدم القاء پیش بر این ژن و یا پاسخ فوق حساسیت و مرگ کامل سلول های حساس در مطالعات تکمیلی مورد توجه قرار گیرد. انجام آزمایش های تکمیلی برای مشخص نمودن کارکرد احتمالی ژن *gsh303* در شرایط بیماری زایی قارچ *A. rabiei* روی گیاه نخود برای تأیید نقش تغییرگری برای پروتئین رمزگذاری شده توسط این ژن ضروری است. همچنین این نتایج، آزمون بیماری زایی درون شیشه ای را به عنوان یک روش اجرایی و کنترل شده برای بررسی مطالعات برهمکنش مولکولی میان قارچ *A. rabiei* و گیاه نخود تأیید نمود.

تشریح و قدردانی

بدین وسیله از از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد و مدیریت پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد بابت فراهم نمودن امکانات و فضای آزمایشگاهی برای این انجام این تحقیق صمیمانه سپاسگزاری می گردد. هزینه های این مطالعه از محل بودجه طرح شماره ۵۵۴۵۶ توسط معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد تامین شده است.

ترانویسی روی ژن های دخیل در بیماری زایی گزارش شده است. برای مثال می توان به عامل ترانویسی VdFTF1 در قارچ *Verticillium dahliae* Kleb. اشاره نمود که بیان عوامل بیماری زایی ترشح شده در طول بیماری زایی را در گیاه پنبه تنظیم می کند (Zhang et al., 2018). همچنین نشان داده شده است که عوامل ترانویسی FTF1 (*Fusarium transcription factor*) در *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Burkholder) Snyder & Hans. تنظیم بیان تعدادی از تغییرگرهای مهم SIX (Secreted-In-Xylem) را تنظیم و افزایش بیان ژن *ffl1* با افزایش بیان این تغییرگرها و بیماری زایی بیمارگر رابطه ای مستقیم دارد (Lanubile et al., 2016).

نتایج این مطالعه علاوه بر یافته های فوق نشان داد که ژنوتیپ MCC133 در بررسی های انجام شده سطح مقاومت بالایی را در برابر بیماری زایی پاتوتیپ های مختلف *A. rabiei* برخوردار است و میزان بروز علائم بیماری با نتایج پژوهش های قبلی مطابقت داشت (Shokouhifar et al., 2006). علائم بیماری موجود در رقم حساس (ILC1929) نیز توسط هر سه پاتوتیپ PI، PIII و PVI مورد تأیید قرار گرفت. هرچند انتظار می رفت، میزان خسارت پاتوتیپ PVI روی لاین ILC1929 بر اساس نتایج ارزیابی های مزرعه ای و گلخانه ای گزارش شده (Shokouhifar et al., 2003) از دیگر پاتوتیپ ها بیشتر باشد، ولی با نتایج مطالعه حاضر با نتایج گزارش شده از آزمون بیماری زایی این لاین در شرایط درون شیشه ای (Firouzmand et al., 2023, Ramezani Khozestani et al., 2023) مطابقت داشت. در مجموع نتایج مایه زنی برگ های ژنوتیپ های حساس و مقاوم با پاتوتیپ های قارچ *A. rabiei* نشان داد روش آزمون بیماری زایی درون شیشه ای می تواند در مطالعات برهمکنش مولکولی مورد استفاده قرار گیرد و قارچ قادر است در شرایط درون شیشه ای روی برگ ها رشد و نمو کند و همچنین تفاوت معنی داری در میزان خسارت روی ژنوتیپ حساس و مقاوم در برابر پاتوتیپ PI، PIII و PVI قابل مشاهده است که با نتایج گزارش شده قبل (Firouzmand et al., 2023) نیز نطباق دارد. نتایج این

REFERENCES

- Anderson, J. P., Sperschneider, J., Win, J., Kidd, B., Yoshida, K., Hane, J., Sauners, D.G., & Singh, K. B. (2017). Comparative secretome analysis of *Rhizoctonia solani* isolates with different host ranges reveals unique secretomes and cell death inducing effectors. *Scientific Reports*, 7(1), 10410. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10405-y>
- Carreón-Anguiano, K. G., Islas-Flores, I., Vega-Arreguín, J., Sáenz-Carbonell, L., & Canto-Canché, B. (2020). EffHunter: A tool for prediction of effector protein candidates in fungal proteomic databases. *Biomolecules*, 10(5), 712. <https://doi.org/10.3390/biom10050712>
- De Wit, P. J., Mehrabi, R., Van den Burg, H. A. and Stergiopoulos, I. (2009) Fungal effector proteins: past, present and future. *Molecular Plant Pathology*, 10, 735-747. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00591.x>
- Emanuelsson, O., Brunak, S., Von Heijne, G. and Nielsen, H. (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature Protocols*, 2, 953-971. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.131>
- Faris, J. D. and Friesen, T. L. (2020) Plant genes hijacked by necrotrophic fungal pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 56, 74-80. doi: 10.1016/j.pbi.2020.04.003.
- Felsenstein, J. (1992). Phylogenies from restriction sites: a maximum - likelihood approach. *Evolution*, 46(1), 159-173. <https://doi/10.1111/j.1558-5646.1992.tb01991.x>
- Firouzman, H., Toosi, S., Shokouhifar, F., & Mamarabadi, M. (2023). Resistance pattern of a cold tolerant chickpea cultivar (Saral) against different pathotypes of *Ascochyta rabiei* using an in vitro pathogenicity test method. *Australasian Plant Pathology*, 52, 303–315. <https://doi.org/10.1007/s13313-023-00920-0>
- Fondevilla, S., Krezdorn, N., Rotter, B., Kahl, G., & Winter, P. (2015). In planta identification of putative pathogenicity factors from the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei* by de novo transcriptome sequencing using RNA-Seq and massive analysis of cDNA ends. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1329. <https://doi: 10.3389/fmicb.2015.01329>
- Fornes, O., Castro-Mondragon, J. A., Khan, A., Van der Lee, R., Zhang, X., Richmond, P. A., Modi, B. P., Correard, S., Gheorghe, M., & Baranašić, D. (2020). JASPAR 2020: update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D87-D92. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1001>
- Gai, Y., Li, L., Liu, B., Ma, H., Chen, Y., Zheng, F., Sun, X., Wang, M., Jiao, C. and Li, H. (2022) Distinct and essential roles of bZIP transcription factors in the stress response and pathogenesis in *Alternaria alternata*. *Microbiological Research*, 256, 126915. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126915
- Ghozlan, M. H., Eman, E.-A., Tokgöz, S., Lakshman, D. K. and Mitra, A. (2020) Plant defense against necrotrophic pathogens. *American Journal of Plant Sciences*, 11, 2122-2138. DOI: 10.4236/ajps.2020.1112149
- Gibriel, H. A., Thomma, B. P., & Seidl, M. F. (2016). The age of effectors: genome-based discovery and applications. *Phytopathology*, 106(10), 1206-1212. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-16-0110-FI>

- John, E., Singh, K. B., Oliver, R. P., & Tan, K. C. (2021). Transcription factor control of virulence in phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology*, 22(7), 858-881. DOI: 10.1111/mpp.13056
- Jones, D. A., Bertazzoni, S., Turo, C. J., Syme, R. A., & Hane, J. K. (2018). Bioinformatic prediction of plant-pathogenicity effector proteins of fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 46, 43-49. DOI: 10.1016/j.mib.2018.01.017
- Kamoun, S. (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 41-60. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143436>
- Kim, W., & Chen, W. (2019). Phytotoxic metabolites produced by legume-associated Ascochyta and its related genera in the Dothideomycetes. *Toxins*, 11(11), 627. <https://doi.org/10.3390/toxins11110627>
- Kumar, K., Purayannur, S., Kaladhar, V. C., Parida, S. K., & Verma, P. K. (2018). mQTL - seq and classical mapping implicates the role of an AT - HOOK MOTIF CONTAINING NUCLEAR LOCALIZED (AHL) family gene in A scochyta blight resistance of chickpea. *Plant, Cell & Environment*, 41(9), 2128-2140. <https://doi.org/10.1111/pce.13177>
- Lanubile, A., Ellis, M. L., Marocco, A., & Munkvold, G. P. (2016). Association of effector Six 6 with vascular wilt symptoms caused by *Fusarium oxysporum* on soybean. *Phytopathology*, 106(11), 1404-1412. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-16-0118-R>
- Li, S., Peng, X., Wang, Y., Hua, K., Xing, F., Zheng, Y., Liu, W., Sun, W., & Wei, S. (2019). The effector AGLIP1 in *Rhizoctonia solani* AG1 IA triggers cell death in plants and promotes disease development through inhibiting PAMP-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2228. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02228>
- Liang, X., Bao, Y., Zhang, M., Du, D., Rao, S., Li, Y., Wang, X., Xu, G., Zhou, Z., Chang, Q., Duan, W., Ai, G., Lu, J., Zhou, J., & Dou, D. (2021). A *Phytophthora capsici* RXLR effector targets and inhibits the central immune kinases to suppress plant immunity. *New Phytologist*, 232(1), 264-278. DOI: 10.1111/nph.17573
- Liu, Z., Zhang, Z., Faris, J. D., Oliver, R. P., Syme, R., McDonald, M. C., McDonald, B. A., Solomon, P. S., Lu, Sh., Shelver, W. L., Xu, S., & Friesen, T. L. (2012). The cysteine rich necrotrophic effector SnTox1 produced by *Stagonospora nodorum* triggers susceptibility of wheat lines harboring Snn1. *PLoS Pathogens*, 8(1), e1002467. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002467>
- Lo Presti, L., Zechmann, B., Kumlehn, J., Liang, L., Lanver, D., Tanaka, S., Bock, R., & Kahmann, R. (2017). An assay for entry of secreted fungal effectors into plant cells. *New Phytologist*, 213(2), 956-964. <https://doi.org/10.1111/nph.14188>
- Lu, S., & Edwards, M. C. (2016). Genome-wide analysis of small secreted cysteine-rich proteins identifies candidate effector proteins potentially involved in *Fusarium graminearum*-wheat interactions. *Phytopathology*, 106(2), 166-176. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-15-0215-R>
- Markstein, M., Markstein, P., Markstein, V., & Levine, M. S. (2002). Genome-wide analysis of clustered Dorsal binding sites identifies putative target genes in the Drosophila embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(2), 763-768. <https://doi.org/10.1073/pnas.012591199>

- Murray, M. G., & Thompson, W. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), 4321-4326. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
- Maurya, R., Singh, Y., Sinha, M., Singh, K., Mishra, P., Singh, S. K., Verma, S., Prabha, K., Kumar, K., & Verma, P. K. (2020). Transcript profiling reveals potential regulators for oxidative stress response of a necrotrophic chickpea pathogen *Ascochyta rabiei*. *3 Biotech*, 10, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2107-8>
- Neu, E., & Debener, T. (2019). Prediction of the *Diplocarpon rosae* secretome reveals candidate genes for effectors and virulence factors. *Fungal Biology*, 123(3), 231-239. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.12.003>
- Ramezani Khozestani, F., Zaker Tavallaie, F., Shokouhifar, F., & Mamarabadi, M. (2023). Optimization of *Ascochyta rabiei* pathogenicity test on resistant and susceptible chickpea cultivars under in vitro condition. *Iranian Journal Pulses Research*.doi: 10.22067/ijpr.2023.77619.1039
- Reddy, D. S., Bhatnagar-Mathur, P., Reddy, P. S., Sri Cindhuri, K., Sivaji Ganesh, A., & Sharma, K. K. (2016). Identification and validation of reference genes and their impact on normalized gene expression studies across cultivated and wild cicer species. *PloS One*, 11(2), e0148451. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148451>
- Rep, M. (2005) Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. *FEMS Microbiology Letters*, 253(1), 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.014>
- Rodriguez-Moreno, L., Ebert, M. K., Bolton, M. D., & Thomma, B. P. (2018). Tools of the crook-infection strategies of fungal plant pathogens. *The Plant Journal*, 93(4), 664-674. <https://doi.org/10.1111/tpj.13810>
- Rozano, L., Jones, D. A., Hane, J. K., & Mancera, R. L. (2023). Template-based modelling of the structure of fungal effector proteins. *Molecular Biotechnology*, 1-30. <https://doi.org/10.1007/s12033-023-00703-4>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Seidl, M. F., Wang, R.-P., Van den Ackerveken, G., Govers, F., & Snel, B. (2012). Bioinformatic inference of specific and general transcription factor binding sites in the plant pathogen *Phytophthora infestans*. *PLoS One*, 7(12), e51295. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051295>
- Shao, D., Smith, D. L., Kabbage, M., & Roth, M. G. (2021). Effectors of plant necrotrophic fungi. *Frontiers in Plant Science*, 12, 687713. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.687713>
- Shokoohifar, F., Bagheri, A., & Rastegar, M. F. (2003). Identification of genetic diversity in the *Ascochyta* blight pathogen of Chickpea [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.] using RAPD markers. *Isfahan University of Technology-Journal of Crop Production and Processing*, 7(2), 193-204. URL: <http://jcopp.iut.ac.ir/article-1-475-en.html>
- Shokouhifar, F., Bagheri, A., & Falahati-Rastegar, M. (2006). Identification of resistant chickpea lines against pathotypes causing *Ascochyta* blight disease in Iran. *Iranian Journal of Biology*, 19(1), 29-42.

- Shokouhifar, F., Rabiei-Motlagh, E., Abbaspour, N., & Toosi, S. (2016). Detection and amplification of LysM effector genes in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Nova Biologica Reperta*, 2(4), 235-249.
- Singh, R., Kumar, K., Purayannur, S., Chen, W., & Verma, P. K. (2022). *Ascochyta rabiei*: A threat to global chickpea production. *Molecular Plant Pathology*, 23(9), 1241-1261. <https://doi.org/10.1111/mpp.13235>
- Singh, S. K., Shree, A., Verma, S., Singh, K., Kumar, K., Srivastava, V., Singh, R., Saxena, A., Pandey, A., & Verma, P. K. (2023). The nuclear effector ArPEC25 from the necrotrophic fungus *Ascochyta rabiei* targets the chickpea transcription factor CaβLIM1a and negatively modulates lignin biosynthesis, increasing host susceptibility. *The Plant Cell*, 35(3), 1134-1159. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac372>
- Sinha, M., Shree, A., Singh, K., Kumar, K., Singh, S. K., Kumar, V., & Verma, P. K. (2021). Modulation of fungal virulence through CRZ1 regulated F-BAR-dependent actin remodeling and endocytosis in chickpea infecting phytopathogen *Ascochyta rabiei*. *PLoS Genetics*, 17(5), e1009137. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009137>
- Sonah, H., Deshmukh, R. K., & Bélanger, R. R. (2016). Computational prediction of effector proteins in fungi: opportunities and challenges. *Frontiers in Plant Science*, 7, 126. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00126>
- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Gardiner, D. M., Manners, J. M., Singh, K. B., & Taylor, J. M. (2015). Advances and challenges in computational prediction of effectors from plant pathogenic fungi. *PLoS Pathogens*, 11(5), e1004806. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004806>
- Sperschneider, J., & Dodds, P. N. (2022). EffectorP 3.0: prediction of apoplastic and cytoplasmic effectors in fungi and oomycetes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 35(2), 146-156. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-21-0201-R>
- Stergiopoulos, I., & de Wit, P. J. (2009). Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 233-263. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.112408.132637>
- Taylor, P. W., & Ford, R. (2007). Diagnostics, genetic diversity and pathogenic variation of *Ascochyta* blight of cool season food and feed legumes. *Ascochyta blights of grain legumes*, 127-133. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6065-6_13
- Verma, S., Gazara, R. K., Nizam, S., Parween, S., Chattopadhyay, D., & Verma, P. K. (2016). Draft genome sequencing and secretome analysis of fungal phytopathogen *Ascochyta rabiei* provides insight into the necrotrophic effector repertoire. *Scientific Reports*, 6(1), 1-14. <https://DOI: 10.1038/srep24638>
- Verma, S., Gazara, R. K., & Verma, P. K. (2017). Transcription factor repertoire of necrotrophic fungal phytopathogen *Ascochyta rabiei*: predominance of MYB transcription factors as potential regulators of secretome. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1037. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01037>
- Vleeshouwers, V., & Oliver, R. P. (2015). Effectors as Tools in Disease Resistance Breeding Against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Plant Pathogens. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 2015(1), 40-50. <https://doi.org/10.1094/mpmi-10-13-0313-ta.testissue>

Wang, X., Jiang, N., Liu, J., Liu, W., & Wang, G. L. (2014). The role of effectors and host immunity in plant–necrotrophic fungal interactions. *Virulence*, 5(7), 722-732. <https://doi.org/10.4161/viru.29798>

Zangene, K., Emamjomeh, A., Shokouhifar, F., Mamarabadi, M., & Mehdinezhad, N. (2022). Differentiation of an Iranian resistance chickpea line to *Ascochyta* blight from a susceptible line using a functional SNP. *AMB Express*, 12(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01385-y>

Zhang, W., Ruan, J., Ho, T. H. D., You, Y., Yu, T., & Quatrano, R. S. (2005). Cis-regulatory element based targeted gene finding: genome-wide identification of abscisic acid-and abiotic stress-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics*, 21(14), 3074-3081. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti490>

Zhang, W. Q., Gui, Y. J., Short, D. P., Li, T. G., Zhang, D. D., Zhou, L., Liu, Ch., Bao, Y. M., Subbarao, k. v., Chen, J. Y., & Dai, X. F. (2018). *Verticillium dahliae* transcription factor VdFTF1 regulates the expression of multiple secreted virulence factors and is required for full virulence in cotton. *Molecular Plant Pathology*, 19(4), 841-857. <https://doi.org/10.1111/mpp.12569>

Zuckerandl, E., & Pauling, L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. *In Evolving genes and proteins* (pp. 97-166). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-2734-4.50017-6>



© 2023 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).



Detection of the *gsh303* Gene Encoding a Candidate Protein with Effector Function during the Interaction between *Ascochyta rabiei* and Chickpea

M. Hasani ¹, F. Shokouhifar ^{2*}, R. Mamarabadi ³

1. Ph.D. student, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran (shokouhifar@um.ac.ir)
3. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 26 June 2023

Accepted: 9 October 2023

Abstract

Background and Objectives

In the context of pathogenicity in host plants, many fungal pathogens produce and secrete a range of small molecules, including proteins and secondary metabolites. Some of these molecules are known as pathogenic factors, and they play a specific role in manipulating interactions between the pathogen and host plants. Typically, these agents are referred to as effectors. Effector proteins are pivotal in the pathogenicity process of phytopathogenic fungi and their colonization of host plants. Identifying and analyzing the functions of effector proteins are essential steps in understanding pathogenicity mechanisms, symbiosis, and plant defense strategies.

Ascochyta blight, caused by the fungus *Ascochyta rabiei*, stands as one of the primary limiting factors in chickpea cultivation, presenting a challenge wherever this plant is grown. The availability of genomic and transcriptomic data for *A. rabiei*, both *in vitro* and during its interaction with the plant, facilitates the identification of virulence and effector genes. In this study, our primary objective was to investigate the *gsh303* gene as a candidate effector in different pathotypes (I, III, and VI) of *A. rabiei*.

Materials and methods

Genomic data associated with *A. rabiei* were obtained from the NCBI database. We utilized SignalP v4.1, SecretomP v2.0, TMHM v2.0, and EffectorP v3.0 software for the screening of candidate effector proteins, ultimately identifying the *gsh303* gene as a potential effector gene. We also conducted an investigation into the presence of homologous and orthologous sequences.

Subsequently, specific primers were designed for the *gsh303* gene, and we tracked its presence in different pathotypes of *A. rabiei*. This was achieved by performing polymerase chain reaction (PCR) both *in vitro* and during the interaction between the plant and pathogen, encompassing both the genome and transcriptome levels.

Results

The findings of our study indicate that the nucleotide sequence of the *gsh303* gene comprises a single exon without any introns. To detect the *gsh303* gene, we designed PSh303F/R specific primers based on its upstream and downstream regions. A 599-base pair fragment was

successfully amplified by PCR, confirming the presence of the gene in the genomes of all three pathotypes.

While the expression of the *gapdh* housekeeping gene was verified at the transcriptome level in the culture medium, we were unable to confirm the detection of the *gsh303* gene at the transcript level. To further investigate the expression of this gene during the plant-pathogen interaction, we inoculated two chickpea cultivars, one resistant (MCC133) and one sensitive (ILC1929), with three pathotypes of *A. rabiei* (I, III, and VI). After 96 hours of inoculation, we collected samples from the inoculated plants for DNA and RNA extraction. Our results from tracking the *gsh303* gene during the interaction conditions at both the genome and transcript levels revealed the amplification of 599 bp and 591 bp fragments, respectively.

Discussion

In our current study, we employed bioinformatics methods to predict the *gsh303* effector gene and identified it as a candidate effector. Furthermore, we confirmed the presence of this gene in all three pathotypes of *A. rabiei* under in vitro conditions. Utilizing fungal genomic DNA as a template, a specific band of 599 base pairs was successfully amplified via PCR. Examining the expression pattern of the *gsh303* gene in two cultivars infected with pathotypes I, III, and VI of *A. rabiei* at the transcriptome level revealed consistent expression 96 hours post-inoculation across all three pathotypes.

The identification of effector genes holds promise for the development of resistance genes based on genomic data, paving the way for the production of more resilient cultivars resistant to disease.

Keywords: *Ascochyta rabiei* pathotypes, detection of effector genes, regulatory elements of gene expression, resistant and sensitive chickpea lines.

Associate editor: R. Mostowfizadeh-Ghalmfarsa (Prof.)

Citation: Hasani, M., Shokouhifar, F. & Mamarabadi, M. (2023). Detection of the *gsh303* Gene Encoding a Candidate Protein with Effector Function during the Interaction between *Ascochyta rabiei* and Chickpea. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 46(2), 87-106. <https://10.22055/ppr.2023.44137.1699>.