



گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)

جلد ۴۶، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۲

doi 10.22055/ppr.2024.45138.1714

## تمایز ژنوتیپ‌های نخود حساس و مقاوم به بیماری برق‌زدگی با استفاده از سامانه تکثیر انتخابی جهش

فرهاد شکوهی فر<sup>۱\*</sup> و مجتبی ممرآبادی<sup>۲</sup>

۱- \*نویسنده مسوول: استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران (shokouhifar@um.ac.ir)

۲- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۰۷

### چکیده

بیماری برق‌زدگی نخود یکی از عوامل مخرب و محدودکننده زراعت نخود در کشورهای مختلف می باشد. شناسایی منابع مقاومت با استفاده از روش‌های مولکولی مبتنی بر ردیابی ژنومی صفت مقاومت می‌تواند در تسریع و افزایش راندمان مؤثر باشد. استفاده از جهش نقطه‌ای کارکردی و آلل‌های مرتبط با مقاومت جهت ردیابی منابع مقاومت با استفاده از روش سامانه تکثیر انتخابی جهش (ARMS) می‌تواند در پیشبرد برنامه‌های گزینش منابع مقاومت به بیماری برق‌زدگی بسیار مؤثر باشد. قطعه دربرگیرنده جهش نقطه‌ای جایگاه GSh118-2773 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در دو ژنوتیپ نخود مقاوم (MCC133) و حساس (ILC263) به بیماری برق‌زدگی تکثیر و توالی‌یابی شد و حضور آلل‌های مرتبط به مقاومت GSh118-2773C و حساسیت GSh118-2773g به ترتیب در نمونه‌های مقاوم و حساس تأیید شد. جفت آغازگرهای اختصاصی ردیاب آلل مقاومت PSh18-Fc و PSh18-R توانست روی ژنوتیپ مقاوم MCC133 قطعه ۳۳۰ جفت بازی مورد انتظار را تکثیر نماید. نتایج تکثیر اختصاصی آلل‌ها را با استفاده از آغازگرهای ردیابی تأیید نمود. استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی آلل مقاومت می‌تواند در مطالعات گزینش مولکولی منابع نخود مقاوم به بیماری برق‌زدگی مورد توجه قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: جهش نقطه‌ای، تنوع آللی، نشانگر مولکولی، مقاومت، *Ascochyta rabiei*

دبیر تخصصی: دکتر سعید عباسی

**Citation:** Shokouhifar, F & Mamarabadi, M. (2024). Differentiation of susceptible and resistant chickpea genotypes to *Ascochyta* blight using the ARMS molecular method. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 46(3), 69-82. <https://10.22055/ppr.2024.45138.1714>.

## مقدمه

نخود یکی از حبوبات زراعی است که در کشورهای متعددی کشت می‌شود. بذرها از این محصول یکی از منابع غنی پروتئین گیاهی به شمار می‌رود که از ارزش غذایی بالایی برخوردار است (Devasirvatham et al., 2012; Mehta et al., 2015). این گیاه در غالب مناطق ایران بخصوص در غرب و شمال غرب با سطح برداشت بالغ بر ۵۹۰۰ هکتار کشت آبی و ۴۹۶ هکتار کشت دیم کشت کار می‌شود و از این منظر ایران در رتبه چهارم، پس از هند، استرالیا و پاکستان قرار دارد (FAO, 2016). از نظر میزان تولید نخود ایران در رتبه هشتم جهانی قرار دارد ولی از نظر متوسط عملکرد از جایگاه خوبی برخوردار نیست. رتبه ایران از نظر متوسط عملکرد در کشت آبی در رده هفدهم و در کشت دیم در رتبه پنجاهم جهان قرار دارد (FAO, 2016). عوامل مختلفی از جمله تنش آبی در کشت دیم، عدم استفاده از نهاده‌ها و فناوری‌های روز، بیماری‌های گیاهی و تورم به عنوان دلیل پایین بودن عملکرد نخود در ایران ذکر شده‌اند (Ghamghami & Beiranvand, 2022).

تنش‌های زیستی، از جمله بیماری برقزدگی ناشی از قارچ بیماری‌زای *Ascochyta rabiei* یکی از بیماری‌های مخرب مزارع نخود است که هر ساله خسارات زیادی را به این محصول در کشورهای مختلف وارد می‌کند (Peever et al., 2012). این بیماری قارچی در برخی از سال‌های پرباران تا ۹۰ درصد از محصول مزارع نخود را از بین برده است. گزارش‌های متعدد نشان می‌دهند که خسارت بیماری برقزدگی به‌خصوص در سال‌های پر بارش که می‌تواند به افزایش عملکرد در زراعت نخود منتج شود، به طور قابل توجهی شیوع یافته و خسارت اقتصادی به کشاورزان وارد می‌نماید. دست‌یابی به منابع مقاومت و تولید ارقام نخود مقاوم به این بیماری می‌تواند از بروز این خسارت‌ها جلوگیری نماید. با این حال، گسترده‌گی مناطق آلوده به این قارچ و تنوع جدایه‌های بیماری‌زا در آن (Shokouhifar et al., 2003a; Shokouhifar et al., 2003b; Nourollahi et al., 2011; Farahani et al., 2019; Farahani et al., 2021)، دست‌یابی به منابع مقاومت

پایدار را با مشکل روبرو نموده‌است. بدین منظور در مطالعات متعددی تنوع ژنتیکی و بیماری‌زایی جدایه‌های این قارچ در مناطق مختلف ایران بررسی شده‌است. در یکی از مطالعه‌های جامع انجام شده جدایه‌های جمع‌آوری از مناطق مختلف ایران در شش گروه پاتوتیپی با قدرت بیماری‌زایی متفاوت گروه‌بندی شده‌اند (Shokouhifar et al., 2003b). بررسی تیپ آمیزشی جدایه‌ها در مناطق مختلف کشور تاییدکننده حضور هر دو تیپ زایشی در مناطق کشور می‌باشد (Mahmoodi & Banihashemi, 2004; Nourollahi et al., 2011; Farahani et al., 2021).

اطلاعات به‌دست آمده از جمعیت این بیمارگر و الگوی حضور تنوع آن در مناطق مختلف کشور می‌تواند مبنای مناسبی را برای شناسایی منابع مقاوم مهیا نماید. گزینش منابع مقاومت در برابر این بیماری یکی از چالش‌های مهم به شمار می‌رود. روش‌های مختلفی برای شناسایی منابع مقاومت در میان ژرم‌پلاسم و همچنین گزینش در حین برنامه‌های اصلاحی مورد توجه بوده است (Shokouhifar et al., 2006; Pande et al., 2011; Newman et al., 2021; Firouzmand et al., 2023; Ramezani Khozestani et al., 2023). روش‌های گزینش مبتنی بر نشانگرهای مولکولی گزینش منابع مقاومت را بر اساس نشانگرهای مولکولی و ژنی ممکن ساخته‌اند (Sudheesh et al., 2021). در اختیار قرار گرفتن روش‌های نوین مولکولی و فراهم شدن داده‌های ژنومی و ترانوشتی می‌تواند مزایای متعددی را در آنالیز داده‌ها داشته و ارزیابی فرآیندهای مولکولی دخیل در بروز پدیده‌های زیستی را تسهیل و تسریع نمایند (Li et al., 2017; Zangene et al., 2022). گزارش ژن‌ها و آلل‌های مرتبط با مقاومت به بیماری برقزدگی سبب شده است تا روش گزینش بر این اساس در برخی از مطالعات به کار گرفته شود (Li et al., 2017; Deokar et al., 2019; Udoh et al., 2021; Singh et al., 2023).

روش گزینش مولکولی با استفاده از سامانه تکثیر انتخابی جهش یا (ARMS)، یکی از روش‌های مولکولی جهت تمایز ژنوتیپ‌ها و آلل‌های مختلف مسئول یک صفت

باکتری *Xanthomonas campestris* pv *vesicatora* در ارقام فلفل با موفقیت بهینه‌سازی شده است و برای گزینش ارقام مقاوم به این بیماری از میان ۸۰ لاین و رقم با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته‌است (Truong et al., 2011).

در نتیجه مقایسه تطبیقی تمام توالی ژنومی (GWAS) ۶۹ ژنوتیپ نخود با درجات متفاوت مقاومت به بیماری برقزدگی یک جهش نقطه‌ای کارکردی در موقعیت ۲۷۷۳ روی ژن *LOC105851082* واقع بر روی کروموزوم شماره ۴ نخود شناسایی شده است (Li et al., 2017). بررسی این جایگاه ژنی در ژنوتیپ نخود مقاوم (MCC133) در مقایسه با توالی این جایگاه در لاین حساس نخود (ILC263) به شناسایی دو آلل متمایز در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس منتج شده است (Zangene et al., 2022). وجود این آلل‌ها در جایگاه‌های جهش نقطه‌ای می‌تواند با استفاده از روش‌های مولکولی مناسب مانند روش ARMS جهت گزینش منابع مقاومت مورد استفاده قرار گیرد (Udoh et al., 2021).

با توجه به مزایای روش مولکولی ARMS و به منظور بهره‌گیری از این روش در گزینش مولکولی منابع مقاومت به بیماری برقزدگی نخود، مطالعه حاضر با هدف بهینه‌سازی روش ردیابی مولکولی آلل‌های مرتبط با مقاومت به بیماری برقزدگی براساس آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای جایگاه جهش نقطه‌ای GSh118-2773 در ژنوتیپ‌های نخود انجام شد.

## مواد و روش‌ها

### آماده‌سازی مواد گیاهی

دو ژنوتیپ نخود حساس (ILC263) و مقاوم (MCC133) به بیماری برقزدگی معرفی شده در مطالعات قبل (Shokouhifar et al., 2006) از بانک بذری پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. بذور پس از ضدعفونی سطحی با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم حاوی یک درصد کلر فعال به مدت ۱۵

در سطح جمعیت هدف است (Newton et al., 1989; Little, 1995). این روش در مقایسه با توالی‌یابی و روش‌های سنتی فنوتیپی می‌تواند با هزینه کمتر و سرعت عمل بالاتر در تمایز آلل‌های یک جهش نقطه‌ای در سطح جمعیت و نمونه‌های ژنتیکی متفاوت مورد استفاده قرار گیرد (Bui & Liu, 2009; Liu et al., 2012). روش ARMS آغازگرهایی را به کار می‌گیرد که برای توالی مورد نظر اختصاصی هستند. حساسیت بالا یکی از ویژگی‌های مهم این روش به شمار می‌رود. آغازگرهای اختصاصی آلل‌ها تنها زمانی امکان تکثیر قطعه را دارند که آلل هدف در محتوی ژنومی نمونه موجود باشد و سایر آلل‌ها قابل تکثیر نخواهند بود. پس از انجام واکنش ARMS حضور محصولات PCR و یا عدم حضور آن‌ها مشخص‌کننده حضور و یا عدم حضور آلل هدف است. (Duta-Cornescu et al., 2009). این روش در حالت معمول می‌تواند ژنوتیپ هتروزیگوت را نیز در یک جایگاه آلی شناسایی نماید (Bui & Liu, 2009). در صورت استفاده از آغازگرهای دارای برجسب فلورسنت متمایز می‌توان از این روش به‌طور هم‌زمان جهت شناسایی آلل‌های مختلف در یک جایگاه جهش نقطه‌ای استفاده نمود (Bui & Liu, 2009; Zhang et al., 2013). به علاوه این روش به مقادیر اندکی از DNA مربوط به آلل هدف بسیار حساس می‌باشد و می‌تواند حضور ژنوتیپ هدف را تشخیص دهد. با استفاده از این روش تنها با مقادیر اندکی از DNA ژنومی گیاه می‌توان حضور آلل‌های مورد نظر را تشخیص داد و به عنوان یک روش غیرمخرب می‌تواند در مطالعات گزینشی مورد استفاده قرار گیرد (Dar et al., 2019).

در مطالعه‌ای روش ARMS در تمایز آلل‌های مربوط به جهش نقطه‌ای کارکردی در جایگاه ژنی pvr2-eIF4E مسئول کنترل مقاومت گیاه فلفل در برابر طیفی از پوتی‌ویروس‌ها با موفقیت به کار گرفته شده است (Rubio et al., 2008). استفاده از روش ARMS در ردیابی آلل‌های مرتبط با ژن *Bs2*، مسئول مقاومت به

1003/ASR003 تهیه شد. سوسپانسیون اسپور قارچ با روش شرح داده‌شده در مطالعه‌های قبلی نگارندگان تهیه و در غلظت مناسب آماده شد (Shokouhifar et al., 2006). گیاهچه‌های مربوط به ژنوتیپ‌های نخود مقاوم و حساس در مرحله پنج برگی با استفاده از ۲۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور پاتوتیپ PIII قارچ *A. rabiei* با غلظت  $10^6$  اسپور در میلی‌لیتر مایه‌زنی شدند. پس از مایه‌زنی، گیاهان به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی در دمای ۱۸ درجه سلسیوس و زیر پوشش‌های پلاستیکی با شرایط اشباع رطوبتی نگهداری شدند و سپس به شرایط دمای ۱۶ و ۲۴ درجه سلسیوس در طول روز و شب با طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت در اتاقک رشد (ساخت شرکت گروگ، ایران) منتقل شدند. تصویربرداری ماکروسکوپی و میکروسکوپی از گیاهچه‌ها و مشاهده‌هایم در روزهای پنجم و پانزدهم پس از مایه‌زنی انجام شد.

### بازیابی توالی ژن و طراحی آغازگر

توالی ژن حامل جهش نقطه‌ای کارکردی SNP18 به شماره بازیابی LOC105851082 واقع بر روی کروموزوم شماره ۴ نخود (Li et al., 2017)، از داده‌های بانک ژن در پایگاه NCBI بازیابی شد. آغازگرهای اختصاصی رفت ردیاب آلل‌های مرتبط با ژنوتیپ‌های نخود مقاوم (MCC133) و حساس (ILC263) بر اساس جایگاه جهش نقطه‌ای 2773 در موقعیت ژن GSh118 با استفاده از نرم‌افزار SnapGene V5.2 به نام‌های PSh118-Fc (5'-GTG TCC CTC TGC TGT GGA CAA TGG -3') و PSh118-Fg (5'-GTC CCT CTG TGG -3') طراحی شد و به همراه یک آغازگر برگشت به نام PSh118.2-R (5'-AGT ACC ACC -3') سیناکلون، ایران ساخته شد (Zangene et al., 2022).

### محتویات PCR و تعیین دمای اتصال بهینه

قطعه‌های هدف با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر با محتویات هر واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix 2x (شرکت سیناکلون، ایران)، ۵ پیکومول از آغازگرهای اختصاصی بسته به هدف

دقیقه و دو بار شستشو در آب مقطر استریل هریک به مدت ۱۰ دقیقه، درون تشتک‌های پتری استریل حاوی کاغذ صافی مرطوب جهت جوانه‌زنی قرار گرفتند و به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی و دمای  $24 \pm 1$  درجه سلسیوس نگهداری شدند (Al-Tanbouz & Abu-Qauod, 2016). پنج بذر جوانه‌زده و سالم حاصل از تک‌گیاه مربوط به هر ژنوتیپ در گلدان‌های حاوی مخلوط کوکوپیت و پرلیت استریل (نسبت ۱ به ۱) و سه بار آبخوبی شده با آب مقطر استریل، جهت تولید گیاهچه سالم کشت شدند. گلدان‌ها به مدت ۴۵ روز در شرایط دمایی ۱۶ تا ۲۴ درجه سلسیوس به ترتیب در طول شب و روز و با دوره روشنایی ۱۶ ساعته درون اتاقک رشد (ساخت شرکت گروگ، ایران) نگهداری شدند.

### نمونه‌برداری و استخراج DNA

در هر گلدان سه گیاهچه سالم و رشد یافته نگهداری شد و مابقی گیاهچه‌ها حذف شدند. از هر گیاهچه سه برگ جوان جهت استخراج DNA جداسازی و در دمای ۸۰- درجه سلسیوس تا زمان تأیید سطح مقاومت گیاهچه‌ها در مقابل بیماری برق‌زدگی نگهداری شدند. استخراج DNA به روش حجم کم و درون میکروتیوب حاوی حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر برگ‌های نمونه‌برداری شده انجام شد (Doyle & Doyle, 1987). کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت. قابل PCR بودن DNA استخراج شده از هر دو ژنوتیپ با استفاده از ردیابی ژن خانه بان *ABCT* گیاه نخود با رس‌شمار (LOC101505577) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی با مشخصات PABCT-5'-TCA CAG GTT GTG ATG GAG TCTG-)F (3'-CCT CAA ATC TTG) PABCT-R و (TTG GGG TGTC-3' مورد بررسی قرار گرفت (Reddy et al., 2016).

### آزمون بیماری‌زایی

جدایه مربوط به پاتوتیپ PIII قارچ *Ascochyta rabiei* شناسایی شده در مطالعات قبلی (Shokouhifar et al., 2003b) از بانک میکروارگانسیم‌های دانشگاه فردوسی مشهد (WDCM 1207) به شماره رفرنس FUM

## نتایج

### تأیید سطح مقاومت گیاهچه‌های ژنوتیپ‌های نخود

اولین علائم بیماری برقرزدگی روی گیاهچه‌های ژنوتیپ‌های نخود مقاوم و حساس هفت روز پس از مایه‌زنی با سوسپانسیون اسپور پاتوتیپ PIII قارچ *A. rabiei* و نگهداری در شرایط گلخانه با بروز زخم‌های کوچک فرورفته ناشی از تخریب لایه اپیدرمی برگ روی ژنوتیپ حساس (ILC263) ظاهر شد و به مرور محل زخم با تغییر رنگ توسعه یافت (شکل ۱-A-D). روی برگچه‌های گیاهان ژنوتیپ مقاوم تیمار شده در زمان هفت روز پس از مایه‌زنی با قارچ با بزرگنمایی ۴ برابر نیز علائم بیماری مشاهده نشد. شدت خسارت بیماری روی ژنوتیپ حساس سبب شد تا در زمان ۱۵ روز پس از مایه‌زنی گیاهچه‌ها با مرگ کامل روبرو شوند در حالی که علائم بیماری برق زدگی در ژنوتیپ نخود مقاوم به بیماری تا زمان ۱۵ روز پس از مایه‌زنی با پاتوتیپ PIII قابل مشاهده نبود.

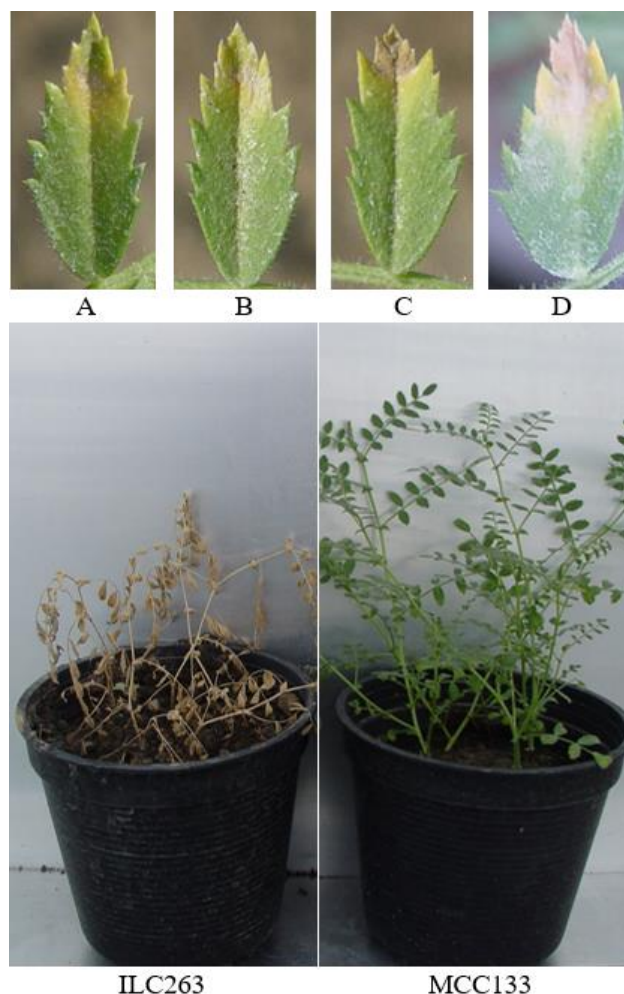
بروز علائم بیماری و روند توسعه آن با علائم گزارش شده مطابق بود (Singh et al., 2022)، عدم مشاهده علائم در نمونه‌های شاهد بدون مایه‌زنی و در تکرارهای مختلف تأییدکننده عدم وجود عامل بیماری‌زا با علائم مشابه در نمونه‌های مورد بررسی بود. علائم بروز یافته روی برگ‌ها و نحوه گسترش آن‌ها با گزارش‌های منتشر شده (Firouzmand et al., 2023) مربوط به ارزیابی کاملاً کنترل‌شده اثرات پاتوتیپ‌های قارچ *A. rabiei* روی ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس در شرایط درون شیشه نیز با علائم مشاهده‌شده روی برگ‌های ژنوتیپ حساس در مطالعه حاضر انطباق داشت.

این نتایج نشان داد که گیاهچه‌های مورد بررسی مربوط به ژنوتیپ MCC133 و ILC263 در مقابل پاتوتیپ PIII قارچ *A. rabiei* به ترتیب مقاوم و حساس می‌باشند. لذا می‌توان محتوی DNA ژنومی این گیاهچه‌ها را به عنوان نماینده واقعی ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس جهت تمایز مورد بررسی قرار داد. الگوی مقاومتی مشاهده‌شده این ژنوتیپ‌ها با سطح مقاومتی و میزان خسارت گزارش شده در مطالعات قبلی (Shokouhifar et al., 2006) منطبق بود.

واکنش، یک میکرولیتر DNA ژنومی (~50 نانوگرم) که در نهایت با آب مقطر استریل به حجم رسانده شد، با برنامه دمایی ۳ دقیقه در  $94^{\circ}\text{C}$  و ۳۵ چرخه با (۴۵ ثانیه در  $93^{\circ}\text{C}$ ، ۴۵ ثانیه در دمای اتصال هر جفت آغازگر و یک دقیقه در  $72^{\circ}\text{C}$ ) و در نهایت ۵ دقیقه در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  در دستگاه ترموسایکلر (BOECO Thermal Cyclor TC-TE, Germany) تکثیر شد. کیفیت قابل PCR بودن DNA استخراج شده توسط ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PABCT-F/R (Reddy et al., 2016) در دمای اتصال ۵۸ درجه سلسیوس بررسی شد. تکثیر قطعه دربرگیرنده جهش موقعیت GSh118-2773 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به نام‌های PSh118-F (5'-3' GAC TGG ACC ACA AGG CTG AAGA) و PSh118-R (5'-3' AGT ACC ACC ACA AGC) (Zangene et al., 2022) در دمای اتصال ۶۲ درجه سلسیوس انجام شد. دمای اتصال آغازگرهای ردیابی آلل‌ها مورد هدف به نام‌های PSh118-Fc و PSh118-Fg با اعمال دمای اتصال ۶۳/۵ تا ۷۰ درجه سلسیوس تعیین شد.

### واکاوی محصول PCR و توالی‌یابی و هم‌ردیفی

محصول واکنش‌های انجام شده بر روی ژل آگارز یک درصد حاوی یک میکرولیتر در میلی‌لیتر رنگ مرئی ساز DNA (green viewer Pars Toos, Iran) الکتروفورز گردید. قطعه تکثیر شده از ژنوتیپ‌های نخود مقاوم و حساس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PSh118-F/R دربرگیرنده جهش موقعیت GSh118-2773 بصورت دوجته توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی توالی‌یابی شد. توالی‌های دوجته با استفاده از نرم افزار Chromas V2.5 (<https://technelysium.com.au>) بر یکدیگر منطبق شد. هم‌ردیفی چندگانه نتایج توالی‌یابی قطعات تکثیر شده از شش ژنوتیپ نخود با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench Premium 23.0.5 انجام شد و آلل‌های مرتبط با ژنوتیپ مقاوم حساس مشخص شد.



شکل ۱- مراحل ظهور و توسعه علائم بیماری برق‌زدگی روی برگچه‌های ژنوتیپ حساس نخود (A-D)، میزان خسارت بیماری روی ژنوتیپ حساس (ILC263) در مقایسه با ژنوتیپ مقاوم (MCC133) پانزده روز پس از مایه زنی گیاهچه‌ها با پاتوتیپ PIII قارچ *A. rabiei*.

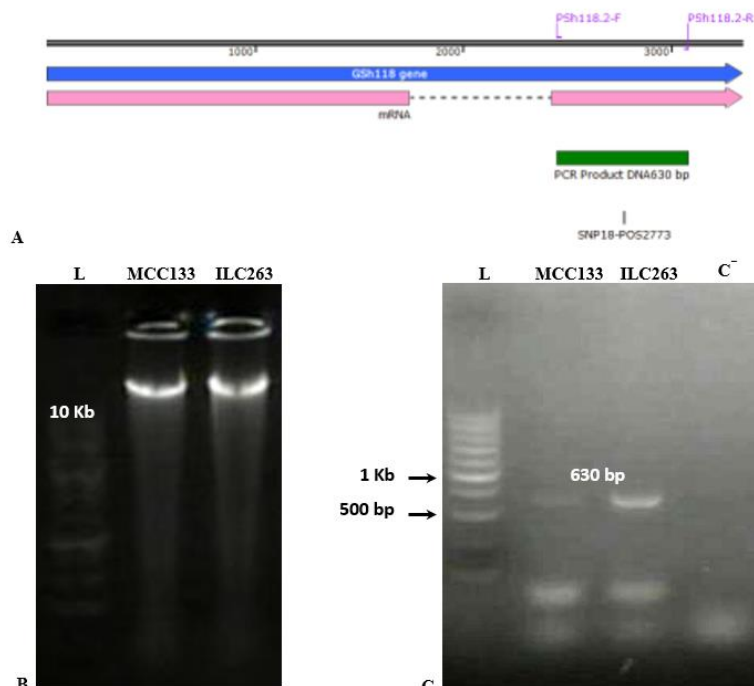
Figure 1. The stages of symptoms emergence and disease development of Ascochy blight on leaflets of susceptible genotype of chickpea (A-D), disease damage on the susceptible genotype (ILC263) compared to the resistant genotype (MCC133) fifteen days after inoculation of the seedlings with the pathotype PIII of *A. rabiei*.

ژنوتیپ‌های نخود مقاوم و حساس در الگوی الکتروفورزی محصول PCR مشاهده نشد.

ردیابی این قطعه در اندازه یکسان در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس نخود با گزارش‌های قبلی (Zangene et al., 2022) انطباق داشت. همچنین مطابق با گزارش (Li et al., 2017)، انتظار می‌رفت تفاوت آللی میان ارقام مقاوم و حساس در جایگاه جهش کارکردی موقعیت SNP pos5275 مشاهده شود. بر این اساس نتایج توالی‌یابی قطعه تکثیر شده به وسیله آغازگرهای PSh118.2-F/R مورد بررسی قرار گرفت.

ردیابی ناحیه دربرگیرنده جهش نقطه‌ای در ژنوتیپ‌های نخود مقاوم و حساس به برق‌زدگی

با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PSh118.2-F/R (Zangene et al., 2022) (شکل ۲-A) ردیابی قطعه دربرگیرنده جهش نقطه‌ای کارکردی GSh118-2773 در موقعیت ژن GSh118 به شماره بازیابی LOC105851082 (Li et al., 2017)، در DNA ژنومی ژنوتیپ‌های نخود حساس (ILC263) و مقاوم (MCC133) به تکثیر یک قطعه اختصاصی در اندازه مورد انتظار به طول ۶۳۰ bp منتج شد (شکل ۲-B). از نظر اندازه قطعه تکثیر شده، تفاوتی میان



شکل ۲- نمای شماتیک ژن GSh118 نشان دهنده موقعیت جهش نقطه ای SNP18-POS5273 در اگزون دوم، آغازگرهای PSh118-F/R و قطعه قابل تکثیر با PCR اختصاصی (A)، الگوی الکتروفورزی DNA استخراج شده از ژنوتیپ های مقاوم (MCC133) و حساس (ILC263) مورد مطالعه (B)، الگوی الکتروفورزی محصول PCR اختصاصی آغازگرهای اختصاصی PSh118-F/R تکثیر شده از ژنوتیپ های مقاوم و حساس (C)، L: نشانگر وزنی DNA یک کیلوبازی

**Figure 2.** Schematic representation of GSh118-2773 gene showing the position of SNP18-POS5273 point mutation on the second exon, the binding site of the PSH118-F/R specific primers and the amplifiable fragment by specific PCR (A). The electrophoresis pattern of extracted DNA from resistant (MCC133) and sensitive genotypes (ILC263) of chickpea (B). The electrophoretic pattern of specific PCR product amplified from resistant and sensitive chickpea genotypes by PSh118-F/R specific primers (C). L: one kb size marker.

نتایج مشاهده شده با نتایج گزارش شده قبلی (Zangene et al., 2022) انطباق نشان می دهد. همچنین تائیدی است بر کاربردی بودن این جهش در تمایز ژنوتیپ های نخود مقاوم و حساس به برق زدگی که قبلا گزارش شده بود (Li et al., 2017). بر اساس این نتایج در موقعیت نوکلئوتید ۲۷۷۳ در ژن LOC105851082 دو آلل مشاهده شد. آلل 2773c که با صفت مقاومت به برق زدگی پیوستگی نشان می دهد و آلل 2773g که به ژنوتیپ دارای صفت حساسیت مربوط می باشد. تمایز ژنوتیپ های مقاوم و حساس با استفاده از این جهش می تواند در تسریع شناسایی منابع مقاومت در برابر برق زدگی قبل از انجام آزمون های بیماری زایی بسیار کاربردی و مفید باشد. با این حال در صورتی که بتوان جایگزینی برای مرحله توالی یابی پیدا نمود می توان انتظار داشت با کاهش هزینه های توالی یابی از این جهش در مراحل گزینش منابع

### ردیابی جهش نقطه ای در ژنوتیپ های نخود

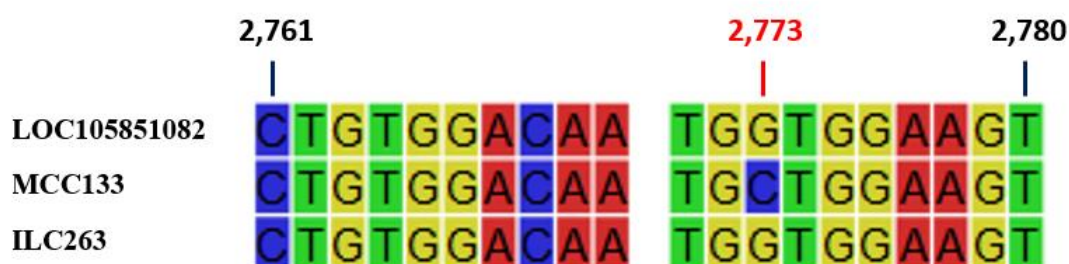
نتایج توالی یابی دوطرفه قطعات تکثیر شده از ژنوتیپ های مقاوم و حساس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پس از همردیفی چند گانه حضور یک جهش نقطه ای در جایگاه ۲۷۷۳ نوکلئوتیدی را نشان داد (شکل ۳). در این جایگاه در ژنوتیپ مقاوم نوکلئوتید سیتوزین مشاهده شد در حالی که در ژنوتیپ حساس مشابه با توالی رفرنس ثبت شده در بانک ژن نوکلئوتید گوانین حضور دارد (شکل ۳). جایگاه نوکلئوتیدی ۲۷۷۳ در منطقه کد کننده اگزون شماره ۲ در ژن LOC105851082 قرار دارد و نوکلئوتید میانی اسید آمینه شماره ۵۵۷ می باشد. این جهش در سطح پروتئین بروز می یابد و در ژنوتیپ مقاوم (MCC133) در این موقعیت اسید آمینه آلانین کد می شود در حالی که در ژنوتیپ حساس (ILC263) در این جایگاه اسید آمینه گلايسين حضور دارد.

قطعه‌ای به طول ۳۳۰ جفت باز به وسیله هر یک از آغازگرهای رفت اختصاصی آلل‌ها به‌طور جداگانه به همراه آغازگر برگشت PSh118-R قابل تکثیر است (شکل ۴). براساس آغازگرهای طراحی شده انتظار می‌رود با استفاده از جفت آغازگر PSh118-Fc و PSh118-R بتوان صرفاً ژنوتیپ‌های دارای آلل مقاومت به برق‌زدگی را در جایگاه GSh118-2773 شناسایی نمود. همچنین برای شناسایی ژنوتیپ‌های حامل آلل حساسیت به بیماری برق‌زدگی نخود می‌توان از جفت آغازگر PSh118-Fg و PSh118-R استفاده نمود.

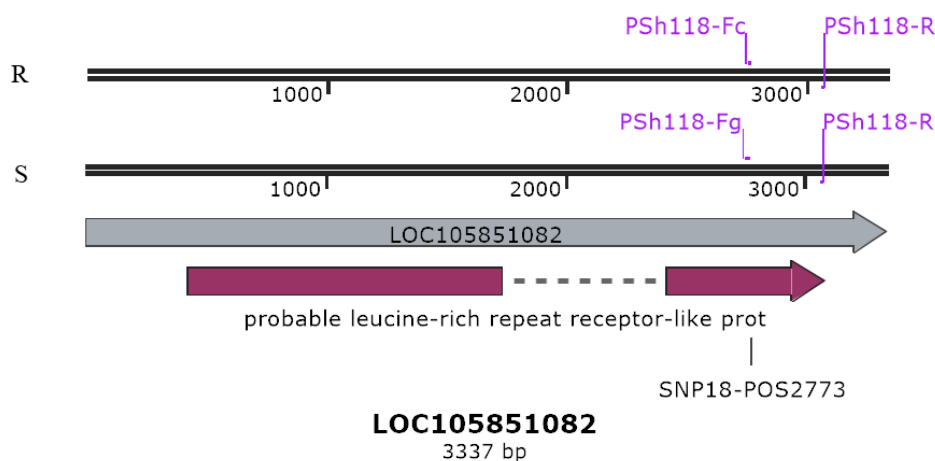
مقاومت استفاده نمود. بدین منظور آغازگرهای اختصاصی متمایزکننده بر اساس روش ARMS به عنوان یک راهکار مناسب مورد بررسی قرار گرفت.

### تمایز ژنوتیپ‌های نخود مقاوم و حساس به بیماری برق‌زدگی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

آغازگرهای رفت اختصاصی طراحی شده جهت تمایز آلل‌های شناسایی شده از جهش کارکردی GSh118-2773 به نام‌های PSh118-Fc (آلل ژنوتیپ مقاوم) و PSh118-Fg (آلل ژنوتیپ حساس) نام‌گذاری شدند.



شکل ۱- نتیجه هم‌ردیفی توالی قطعات تکثیر شده با استفاده از آغازگرها PSh118-F/R نشان دهنده تفاوت آلی جایگاه ۲۷۷۳ ژن LOC105851082 در ژنوتیپ‌های نخود MCC133 (مقاوم) و ILC263 (حساس) در مقایسه با توالی رفرنس استحصالی شده از بانک ژن Figure 3. The Multiple sequence alignment of fragments amplified using PSh118-F/R primers showing the allelic difference of position 2773 on the LOC105851082 gene in MCC133 (resistant) and ILC263 (susceptible) chickpea genotypes compared to the reference sequence retrieved from the gene bank.



شکل ۴- نمای شماتیک موقعیت آغازگرهای اختصاصی روش ARMS بر اساس جهش نقطه‌ای کارکردی در موقعیت ۲۷۷۳ روی توالی ژن LOC105851082 با قابلیت تکثیر قطعه ۳۳۱ جفت باز در ژنوتیپ‌های هدف، R: جفت آغازگر PSh118-Fc/R جهت تمایز ژنوتیپ‌های نخود مقاوم به بیماری برق‌زدگی، S: جفت آغازگر PSh118-Fg/R جهت تمایز ژنوتیپ‌های نخود حساس به بیماری برق‌زدگی

Figure 4. Schematic representation of the position of specific primers belong to the ARMS technique based on the functional point mutation at position 2773 on the LOC105851082 gene sequence with the ability to amplify a 331 bp fragment in the target genotypes. R: PSh118-Fc/R primer pair for differentiating chickpea genotypes resistant to *Ascochyta* blight disease. S: PSh118-Fg/R primer pair for differentiating chickpea genotypes sensitive to *Ascochyta* blight disease.



جفت آغازگرهای اختصاصی آلل های C و G مربوط به جهش نقطه‌ای جایگاه GSh118-2773 در دمای اتصال ۶۵/۵ درجه سلسیوس در ژنوتیپ‌های نخود مقاوم و حساس مورد مطالعه کاملاً متمایز بود (شکل ۶). همانگونه که انتظار می‌رفت در الگوی الکتروفورزی مربوط به ژنوتیپ MCC133 به عنوان ژنوتیپ مقاوم تنها با استفاده از جفت آغازگر PSh18-R و PSh18-Fc یک قطعه اختصاصی در محدود ۳۳۰ جفت باز مشاهده شد، در حالی که این جفت آغازگر در ژنوتیپ حساس (ILC263) نتوانست قطعه‌ای را تکثیر نماید. در مقابل جفت آغازگر PSh18-Fg و PSh18-R توانست آلل مربوط به ژنوتیپ حساس را صرفاً در ژنوتیپ ILC263 ردیابی و قطعه مورد نظر را تکثیر نماید در حالی که این نتیجه در الگوی الکتروفورزی تکثیر شده از ژنوتیپ MCC133 مشاهده نشد (شکل ۶).

### بحث

با توجه به ویژگی‌هایی نظیر حساسیت بالا، عملکرد اختصاصی، سرعت عمل، توانایی عملکرد چندگانه، سازگاری با روش‌های دارای بازدهی بالا، غیرمخرب بودن و صرفه اقتصادی در این مطالعه از روش سامانه تکثیر انتخابی جهش برای تمایز ژنوتیپ‌های نخود مقاوم به بیماری برق‌زدگی نخود استفاده شد.

### بهینه‌سازی دمای اتصال متمایز کننده آلل‌های

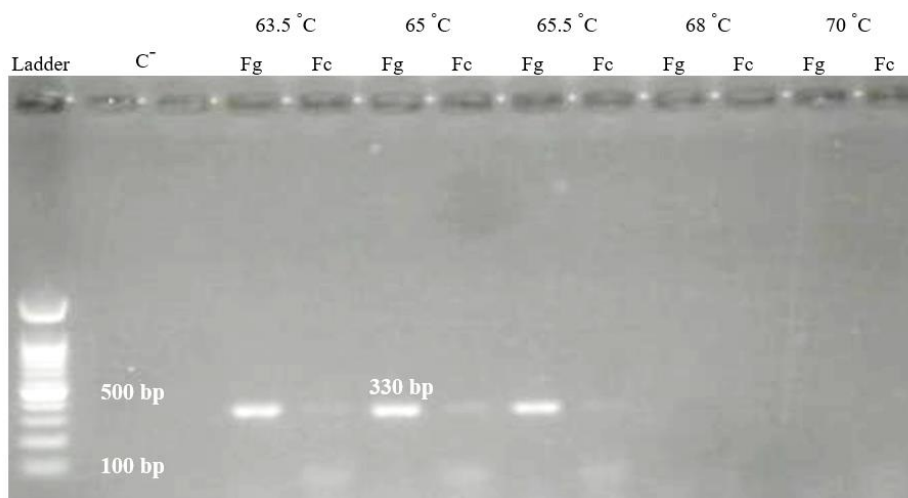
#### جهش GSh118-2773

آغازگرهای طراحی شده جهت تمایز آلل‌های جایگاه GSh118-2773 در انتهای ۳ آغازگر رفت تنها در یک نوکلئوتید با یکدیگر متفاوت هستند، لذا انتظار می‌رود در دمای اتصال اختصاصی قادر باشند آلل‌های متناظر خود را شناسایی نمایند. نتایج بررسی دامنه دمایی میان ۶۳ تا ۷۰ درجه سلسیوس به عنوان دمای اتصال نشان داد جفت آغازگر PSh118-R و PSh118-Fg مرتبط با ژنوتیپ‌های حساس، روی DNA ژنومی مربوط به رقم مقاوم در دامنه دمایی مورد بررسی قطعه کاملاً واضحی را تکثیر نمود (شکل ۵). جفت آغازگر PSh118-R و PSh118-Fc به عنوان مسئول شناسایی آلل مرتبط با مقاومت در دماهای اتصال ۶۳/۵ تا ۶۵/۵ درجه سلسیوس قطعه مورد انتظار را روی DNA ژنومی مربوط به رقم مقاوم (MCC133) تکثیر نمود ولی در دماهای بالاتر قطعه مورد نظر در محصول واکنش مشاهده نشد. بر اساس این نتایج می‌توان دمای ۶۶/۵ درجه سلسیوس را به عنوان دمای اتصال نهایی برای تکثیر قطعه مورد نظر برای جفت آغازگر PSh118-R و PSh118-Fc در نظر گرفت.

### تمایز ژنوتیپ‌های نخود مقاوم و حساس به بیماری

#### برق‌زدگی با استفاده روش ARMS

نتایج الگوی الکتروفورزی محصول PCR با استفاده از



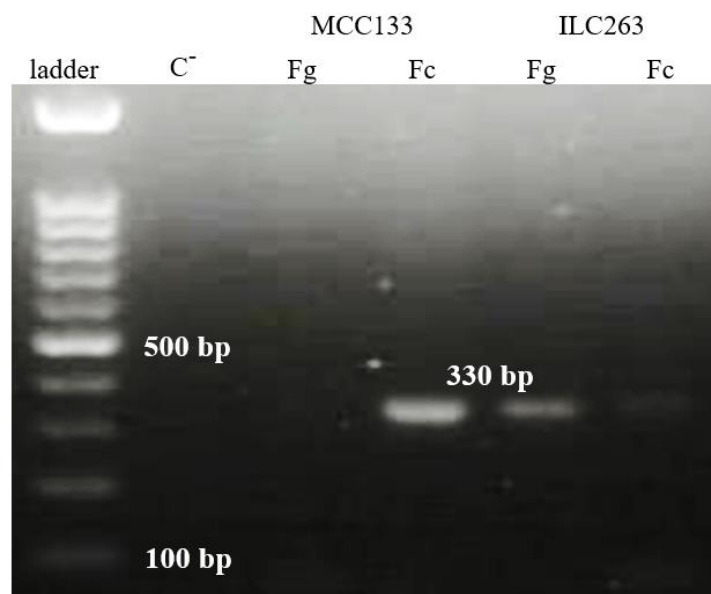
شکل ۵- قطعات تکثیر شده با استفاده از دمای بهینه جهت تمایز اختصاصی آلل 2773c روی DNA ژنومی ژنوتیپ مقاوم نخود به بیماری برق‌زدگی (MCC133).

Figure 5. Amplified fragments using optimal temperature for specific differentiation of allele 2773c on genomic DNA of chickpea genotype resistant to *Ascochyta blight* disease (MCC133).

2773g مرتبط با حساسیت مورد تأیید قرار گرفت. در مطالعه حاضر به دلیل در اختیار بودن آلل‌های مرتبط با مقاومت که قبلاً گزارش شده بود (Truong et al., 2011; Li et al., 2017; Deokar et al., 2019; Zangene et al., 2022)، تنها دو آلل مورد بررسی قرار گرفت، در حالی که در مطالعات انجام‌شده روی گیاهان دیگر مانند ژن مقاومت Bs2، مسئول مقاومت به بیمارگر *Xanthomonas campestris pv vesicatora* برای گزینش منابع مقاومت در میان ۸۰ لاین و رقم فلفل استفاده شده‌است (Truong et al., 2011). هرچند در مناطق کدکننده و غیر کدکننده ژن Bs2 تفاوت‌هایی میان ارقام مقاوم و حساس شناسایی شده‌است ولی در نهایت برای دست‌یابی به یک نشانگر کارکردی برای گزینش منابع مقاومت صرفاً روی یک جهش نقطه‌ای جهت تمایز ژنوتیپ‌های مقاوم متمرکز شده‌اند و از میان چهار آلل بررسی‌شده در این جایگاه صرفاً دو آلل G/C جهت شناسایی منابع مقاومت استفاده شده‌است.

در مطالعه حاضر بر اساس گزارش‌های قبلی مبنی بر حضور یک جهش نقطه‌ای کارکردی به نام GSh118-2773 در توالی ژن GSH118 به شماره بازیابی LOC105851082 (Li et al., 2017) و تأیید قابلیت آلل‌های این جایگاه در تمایز ژنوتیپ‌های نخود مقاوم و حساس با استفاده از روش توالی‌یابی (Zangene et al., 2022)، آغازگرهای اختصاصی آلل‌های مرتبط به مقاومت GSh118-2773C و حساسیت GSh118-2773g طراحی و شرایط انجام PCR اختصاصی برای تمایز ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس بهینه‌سازی شد.

ابتدا سطح مقاومت و حساسیت گیاهچه‌های مربوط به ژنوتیپ‌های مقاوم (MCC133) و حساس (ILC263) مورد مطالعه با انجام آزمون بیماری‌زایی در برابر پاتوتیپ PIII قارچ *A. rabiei* و بررسی روند بروز علائم در برگها در مقایسه با گیاهان شاهد مورد تأیید قرار گرفت. قطعه دربرگیرنده جهش نقطه‌ای GSh118-2773 با آغازگرهای اختصاصی PSh118.2-F/R (Zangene et al., 2022) از هر دو ژنوتیپ تکثیر و توالی‌یابی شد و حضور آلل‌های GSh118-2773C مرتبط با مقاومت و آلل GSh118-



شکل ۶- الگوی الکتروفورزی محصول PCR با استفاده از جفت آغازگر (Fc)، PSh18-Fc و PSh18-R (ردیاب آلل مربوط به مقاومت) و جفت آغازگر (Fg)، PSh18-Fg و PSh18-R (ردیاب آلل مربوط به حساسیت) روی ژنوتیپ‌های MCC133 (مقاوم) و ILC263 (حساس) به بیماری برق‌زدگی نخود.

Figure 6. Electrophoretic pattern of PCR product using primer pair (Fc), PSh18-Fc and PSh18-R (resistance allele detector) and primer pair (Fg), PSh18-Fg and PSh18-R (susceptibility allele detector) on MCC133 (resistant) and ILC263 (susceptible) chickpea genotypes to Ascochyta blight.

PCR حائز اهمیت باشد و در مطالعات مشابه مورد تاکید بوده است (Liu et al., 2012). بر این اساس صرفاً آغازگرهای رفت برای شناسایی دو آلل C و G در جایگاه GSh18-2773 طراحی شد و از آغازگر برگشت یکسان برای انجام هر دو واکنش استفاده شد.

در مطالعه حاضر روی هر ژنوتیپ تنها یک جفت از آغازگرها توانستند قطعه هدف را تکثیر نمایند، در صورتی که در هر دو واکنش روی یک ژنوتیپ قطعه مورد نظر تکثیر شود بنابراین می توان نتیجه گرفت که ژنوتیپ نمونه های گیاهی مورد نظر در جایگاه آلی هدف هتروزیگوت است (Bui & Liu, 2009). با بهینه سازی روش تکثیر انتخابی جهش برای ردیابی آلل مرتبط با مقاومت در مطالعه حاضر می توان انتظار داشت در مراحل تکمیلی گزینش مبتنی بر نشانگر حاضر روی تعداد زیادی از نمونه های ژرم پلاسمی نخود انجام شود و ژنوتیپ های نامزد برای تکمیل بررسی ها انتخاب شوند.

### نتیجه گیری

در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد روش تکثیر انتخابی جهش می تواند ژنوتیپ های نخود مقاوم و حساس به بیماری برق زدگی را بر اساس آلل های گزارش شده در جهش نقطه ای مربوط به جایگاه GSh18-2773 با دقت از یکدیگر متمایز نماید. همچنین توانایی استفاده از این روش را در برنامه های گزینش منابع مقاومت به بیماری برق زدگی در نمونه های ژرم پلاسم نخود مبتنی بر نشانگرهای مولکولی تأیید نمود.

### سپاس گذاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد و پژوهشکده علوم گیاهی به سبب مساعدت در مهیا نمودن امکانات آزمایشگاهی و گلخانه ای در انجام این تحقیق سپاسگزاری می گردد. بودجه انجام این تحقیق از محل اعتبار اختصاص یافته به طرح شماره ۵۹۱۳۵ توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد تامین شده است.

با استفاده از آلل های این جایگاه ژنی در مطالعات گزینش مبتنی بر نشانگرهای مولکولی موفق شده اند تا یک لاین مقاوم فلفل حامل ژن Bs2 دارای آلل مقاومت را شناسایی و تجاری سازی نمایند. هنگام مقایسه این مطالعه با مطالعه صورت گرفته روی نخود می توان دریافت که تنوع گزارش شده روی توالی دربرگیرنده جهش نقطه ای GSh18-2773 روی ژن GSh18 نیز با حضور سه جهش نقطه ای دیگر نیز همراه بوده است (Zangene et al., 2022) ولی در نهایت تنها روی آلل های مشاهده شده در جایگاه یک جهش نقطه ای جهت تمایز ژنوتیپ های مقاوم و حساس تمرکز شده است.

بر اساس آلل های مشاهده شده در جایگاه GSh18-2773 آغازگرهای اختصاصی ردیاب آلل ها جهت انجام روش ARMS با درج نوکلئوتید هدف در نوکلئوتید انتهای ۳' آغازگرهای رفت طراحی شدند. در روش ARMS با به کارگیری آغازگرهای اختصاصی هر آلل نتیجه می تواند به تکثیر قطعه و یا عدم تکثیر آن مربوط باشد (Furtado et al., 2016). از آنجا که در ژنوتیپ مقاوم در جایگاه GSh18-2773 در توالی موافق نوکلئوتید سیتوزین حضور دارد تنها آغازگر رفت PSh18-Fc که حامل باز مشابه در جایگاه ۳' خود است قادر به اتصال صحیح در نوکلئوتید انتهای ۳' خواهد بود. از آنجا که اتصال این نوکلئوتید برای شروع همانندسازی آنزیم DNA پلیمراز Taq ضروری است لذا انتظار می رود در الگوی الکتروفورزی نتایج PCR مربوط به ژنوتیپ مقاوم MCC133 واکنش تکثیر انجام شود و قطعه ۳۳۰ جفت بازی در الگوی الکتروفورزی مربوط مشاهده شود. نتایج حاصل به خوبی نشان داد که با استفاده از جفت آغازگر PSh18-Fc و PSh18-R الگوی مورد انتظار حاصل شده است. در مقابل جفت آغازگر PSh18-Fg و PSh18-R روی این ژنوتیپ نتوانست قطعه ای را تکثیر نماید. تکثیر قطعات هم اندازه توسط جفت آغازگرهای تشخیص دهنده آلل های مختلف می تواند در راندمان و قابلیت قیاس روش

## References

- Al-Tanbouz, R., & Abu-Qauod, H. (2016). In vitro regeneration of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 17(1&2), 21-30.
- Bui, M., & Liu, Z. (2009). Simple allele-discriminating PCR for cost-effective and rapid genotyping and mapping. *Plant Methods*, 5(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-5-1>
- Dar, A. A., Mahajan, R., & Sharma, S. (2019). Molecular markers for characterization and conservation of plant genetic resources. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 89(11), 1755-1763. <https://doi.org/10.56093/ijas.v89i11.95286>
- Deokar, A., Sagi, M., & Tar'an, B. (2019). Genome-wide SNP discovery for development of high-density genetic map and QTL mapping of *Ascochyta* blight resistance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 132, 1861-1872. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03322-3>
- Devasirvatham, V., Gaur, P. M., Mallikarjuna, N., Tokachichu, R. N., Trethowan, R. M., & Tan, D. K. (2012). Effect of high temperature on the reproductive development of chickpea genotypes under controlled environments. *Functional Plant Biology*, 39(12), 1009-1018. <https://doi.org/10.1071/FP12033>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*.
- Duta-Cornescu, G.E.O.R.G.I.A.N.A., Simon-Gruita, A.L.E.X.A.N.D.R.A., Constantin, N., Stanciu, F., Dobre, M., Banica, D., Tuduce, R., Cristea, P., & Stoian, V. (2009). A comparative study of ARMS-PCR and RFLP-PCR as methods for rapid SNP identification. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(6), 4845-4850.
- FAO. (2016). Food and Agricultural Organization. [www.fao.org](http://www.fao.org). Accessed 10 May 2022. [www.fao.org](http://www.fao.org).
- Farahani, S., Talebi, R., Maleki, M., Mehrabi, R., & Kanouni, H. (2019). Pathogenic diversity of *Ascochyta rabiei* isolates and identification of resistance sources in core collection of chickpea germplasm. *The plant pathology journal*, 35(4), 321. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.12.2018.0299>
- Farahani, S., Talebi, R., Maleki, M., Mehrabi, R., & Kanouni, H. (2021). Mating type distribution, genetic diversity and population structure of *Ascochyta rabiei*, the cause of *Ascochyta* blight of chickpea in western iran. *Phytopathologia Mediterranea*, 60(1), 3-11. <https://doi.org/10.36253/phyto-11616>
- Firouzmand, 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*, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s13313-023-00920-0>
- Furtado, L. F. V., Alves, W. P., Moreira, T. B., Junior, L. M. C., Miranda, R. R. C., & Rabelo, É. M. L. (2016). Standardization and application of the tetraprimer ARMS-PCR technique for screening of the E198A SNP in the  $\beta$ -tubulin gene of hookworm populations in Brazil. *Veterinary parasitology*, 224, 65-67. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.013>
- Ghamghami, M., & Beiranvand, J. P. (2022). Rainfed crop yield response to climate change in Iran. *Regional Environmental Change*, 22, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s10113-021-01856-1>

- Li, Y., Ruperao, P., Batley, J., Edwards, D., Davidson, J., Hobson, K., & Sutton, T. (2017). Genome analysis identified novel candidate genes for *Ascochyta* blight resistance in chickpea using whole genome re-sequencing data. *Frontiers in Plant Science*, 8, 359. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00359>
- Little, S. (1995). Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Current protocols in human genetics*, 7(1), 9-8. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0908s07>
- Liu, J., Huang, S., Sun, M., Liu, S., Liu, Y., Wang, W., Zhang, X., Wang, H., & Hua, W. (2012). An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. *Plant Methods*, 8, 34. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-34>
- Mahmoodi, F., & Banihashemi, Z. (2004). Distribution of mating type, teleomorph formation, and genetic diversity in *Didymella rabiei* the causal agent of chickpea blight in fars province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 40, 15-30.
- Mehta, G., Verma, P. K., & Ravi, M. (2015). Correlation studies in chickpea grown under rainfed and irrigated conditions in Northern Plains of India. *Journal of Agroecology and Natural Resource Management*, 2(5), 388-390.
- Newman, T.E., Jacques, S., Grime, C., Kamphuis, F.L., Lee, R.C., Berger, J., & Kamphuis, L.G. (2021). Identification of novel sources of resistance to *Ascochyta* blight in a collection of wild *Cicer* accessions. *Phytopathology*, 111(2), 369-379. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-20-0137-R>
- Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., Powell, S.J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J.C., & Markham, A. (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research*, 17(7), 2503-2516. <https://doi.org/10.1093/nar/17.7.2503>
- Nourollahi, K., Javannikkhah, M., Naghavi, M.R., Lichtenzveig, J., Okhovat, S.M., Oliver, R.P., & Ellwood, S. R. (2011). Genetic diversity and population structure of *Ascochyta rabiei* from the western Iranian Ilam and Kermanshah provinces using MAT and SSR markers. *Mycological progress*, 10, 1-7.
- Pande, S., Sharma, M., Gaur, P.M., Tripathi, S., Kaur, L., Basandrai, A., Khan, T., Gowda, C.L.L., & Siddique, K. H. M. (2011). Development of screening techniques and identification of new sources of resistance to *Ascochyta* blight disease of chickpea. *Australasian Plant Pathology*, 40, 149-156. <http://dx.doi.org/10.1007/s13313-010-0024-8>
- Peever, T. L., Chen, W., Abdo, Z., & Kaiser, W. J. (2012). Genetics of virulence in *Ascochyta rabiei*. *Plant Pathology*, 61(4), 754-760. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02566.x>
- 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 of Pulses Research*. <https://doi.org/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>

- Rubio, M., Caranta, C., & Palloix, A. (2008). Functional markers for selection of potyvirus resistance alleles at the pvr2-eIF4E locus in pepper using tetra-primer ARMS-PCR. *Genome*, 51(9), 767-771. <https://doi.org/10.1139/G08-056>
- Shokouhifar, F., Bagheri, A., & Rastegar, M. F. (2003a). 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.
- Shokouhifar, F., Bagheri, A., Falahat-Rastegar, M. and Malekzadeh-Shafaroodi, S. (2003b). Pathotyping of *Ascochyta rabiei* isolates in Iran. *Jornal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 37, 217-232.
- Shokouhifar, F., Bagheri, A. and Falahati-Rastegar, M. (2006). Identification of resistant chickpea lines against pathotypes causing *Ascochyta* blight disease in Iran. *Iranian Journal of Biology*, 19, 29-42.
- 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, R., Kumar, K., Purayannur, S., & Verma, P. K. (2023). Genomics-assisted genetics of complex regions from chickpea chromosome 4 reveals two candidate genes for *Ascochyta* blight resistance. *Plant Science*, 334, 111781. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111781>
- Sudheesh, S., Kahrood, H. V., Braich, S., Dron, N., Hobson, K., Cogan, N. O., & Kaur, S. (2021). Application of genomics approaches for the improvement in *Ascochyta* blight resistance in chickpea. *Agronomy*, 11(10), 1937. <https://doi.org/10.3390/agronomy11101937>
- Truong, H. T. H., Kim, K. T., Kim, S., Cho, M. C., Kim, H. R., & Woo, J. G. (2011). Development of gene-based markers for the Bs2 bacterial spot resistance gene for marker-assisted selection in pepper (*Capsicum* spp.). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 52, 65-73. <https://doi.org/10.1007/s13580-011-0142-4>
- Udoh, L. I., Obaseoji, W. P., & Uzoebo, C. (2021). Single nucleotide polymorphisms: a modern tool to screen plants for desirable traits. In *Plant breeding-current and future views*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94935>
- 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, C., Liu, Y., Ring, B.Z., Nie, K., Yang, M., Wang, M., Shen, H., Wu, X., & Ma, X. (2013). A novel multiplex tetra-primer ARMS-PCR for the simultaneous genotyping of six single nucleotide polymorphisms associated with female cancers. *PloS one*, 8(4), e62126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062126>





## Differentiation of susceptible and resistant chickpea genotypes to *Ascochyta* blight using the ARMS molecular method

F. Shokouhifar<sup>1\*</sup>, M. Mamarabadi<sup>2</sup>

1. **\*Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran (shokouhifar@um.ac.ir)
2. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 29 October 2023

Accepted: 20 January 2024

### Abstract

#### Background and Objectives

Chickpea, cultivated in rainfed and irrigated fields across many countries. In terms of chickpea cultivation area, Iran ranks fourth, after India, Australia and Pakistan, and in terms of chickpea production, Iran ranks eighth in the world, but it does not have a good position in terms of average yield. Iran ranks 17th in terms of average yield in irrigated agriculture and 50th in rainfed agriculture in the world. Various factors such as water stress in rainfed cultivation, lack of modern inputs and technologies have been mentioned as reasons for the low yield of chickpeas in Iran. Chickpea also faces biological stresses such as *Ascochyta* blight caused by the pathogenic fungus *Ascochyta rabiei*. This disease poses a severe threat to chickpea fields, resulting in substantial annual damage in various countries. Identifying resistance sources through molecular methods, specifically genomic tracking of the resistance trait, holds the potential to expedite and enhance control measures effectively. The use of the Amplification Refractory Mutation System (ARMS) method, involving functional point mutations and resistance-related alleles, proves highly efficient in advancing selection programs targeted at combating *Ascochyta* blight.

#### Materials and methods

Pots containing two chickpea genotypes, sensitive (ILC263) and resistant (MCC133) to *Ascochyta* blight were cultivated and kept for 45 days under greenhouse conditions. The fragment harboring the SNP18-Pos57723 point mutation within the *GSh118* gene sequence underwent amplification and sequencing using PSh118-F/R specific primers. This process utilized DNA extracted from both resistant (MCC113) and susceptible (ILC263) chickpea genotypes. The identification of alleles associated with resistance and sensitivity was established. Distinct differentiating primers were formulated for resistant (PSh118-Fc and PSh118-R) and sensitive (PSh18-Fg and PSh18-R) genotypes. The specific annealing temperature for each reaction was determined through a temperature gradient analysis. The efficacy of the designed primers in distinguishing between resistant and sensitive genotypes was assessed by conducting PCR and comparing their electrophoresis patterns.

#### Results

The first symptoms of *Ascochyta* blight disease was observed on seedlings of resistant and sensitive chickpea genotypes seven days after fungal inoculation under greenhouse conditions. The fragment containing the functional point mutation related to *GSh118* gene was tracked using PSh118.2-F/R specific primers in the genomic DNA of susceptible (ILC263) and resistant (MCC133) chickpea genotypes so that after PCR amplification resulted a specific fragment with the expected size of 630 bp.

The presence of alleles linked to GSh18-2773C resistance and GSh18-2773g sensitivity was confirmed in resistant and sensitive chickpea genotypes, respectively. The specific primers PSh18-Fc and PSh18-R, designed for detecting the resistance allele, successfully amplified the expected 330 bp fragment in the resistant chickpea genotype MCC133. The study results affirmed the accurate amplification of alleles using these designated primers.

### **Discussion**

In the present study, the ARMS method, known for its high sensitivity, specificity, rapidity, cost-effectiveness, multiplexing capabilities, compatibility with high throughput methods, and non-destructive nature, was employed to differentiate chickpea genotypes resistant to *Ascochyta* blight. The ARMS method's effectiveness in selecting resistance sources among various plant lines and cultivars has been demonstrated through allele tracking related to the resistance gene in prior studies. The results of this study indicated that the ARMS method accurately distinguishes chickpea genotypes resistant and sensitive to *Ascochyta* blight based on alleles associated with the GSh18-2773 position's point mutation. Thus, employing specific primers for the resistance allele is recommended in molecular selection studies of chickpea sources resistant to *Ascochyta* blight.

**Keywords:** *Point mutation, allelic variation, molecular markers, resistance, Ascochyta rabiei*

---

Associate editor: S. Abbasi (Ph.D.)

**Citation:** Shokouhifar, F & Mamarabadi, M. (2024). Differentiation of susceptible and resistant chickpea genotypes to *Ascochyta* blight using the ARMS molecular method. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 46(3), 69-82. <https://10.22055/ppr.2024.45138.1714>.