



## شناسایی مسیرها و ژن‌های کاندید مقاومت به بیماری آسکوکیتا در یک وارسته موتانت نخود به روش آنالیز RNA-Seq

معصومه سبکباری ابرغان<sup>1</sup>، خلیل زینلی نژاد<sup>2</sup>، اسماعیل ابراهیمی<sup>3</sup> و حسن سلطانیلو<sup>4</sup>

1 و 4- دانشجوی دکتری و دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان  
2- استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، (نویسنده مسؤل: Khalil1381@yahoo.com)  
3- دانشیار دانشگاه شیراز، پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز  
تاریخ دریافت: 98/01/31 تاریخ پذیرش: 98/05/15  
صفحه: 69 تا 75

### چکیده

نخود در طول دوره رشد با تنش‌های زیستی و غیرزیستی مختلفی درگیر است. سوختگی آسکوکیتایی یکی از مخرب‌ترین تنش‌های زیستی کاهنده عملکرد این محصول می‌باشد. اصلاح برای دستیابی به ارقام مقاوم مهم‌ترین روش برای مقابله با این بیماری است. بررسی الگوی بیان ژن‌ها و مشخص کردن ژن‌های مقاوم به بیماری با استفاده از تکنیک RNA-Seq اطلاعات ارزشمندی را در اختیار اصلاحگران قرار می‌دهد. در این تحقیق الگوی بیان دو وارسته حساس (C-727) و مقاوم (C-88) به بیماری آسکوکیتا تحت آلودگی، مورد بررسی قرار گرفت. استخراج RNA از برگ‌های گیاهان تحت بیماری آسکوکیتا انجام گرفته به‌همین منظور سه نمونه بیولوژیک ادغام‌شده و یک نمونه از هر وارسته مورد توالی‌یابی قرار گرفت. توالی‌یابی با Illumina HiSeq انجام شد. و کتابخانه RNA عاری از RNA ریبوزومی تهیه گردید در نتیجه 82848250 خوانش از CM-88 و 72346680 خوانش از C-727 به‌دست آمد. در مجموع 3106 ژن با بیان افتراقی مشخص گردید. از این بین 1546 ژن در CM-88 نسبت به C-727 کاهش بیان و 1560 ژن افزایش بیان داشتند. پس از آنالیز KEGG، 1285 ژن در 122 مسیر زیستی KEGG قرار گرفتند. از 1285 ژن، 627 ژن در وارسته CM-88 نسبت به وارسته C-727 کاهش بیان داشته و 607 ژن افزایش بیان داشتند. نتایج آنالیز KEGG نشان داد مسیر N-Glycan biosynthesis، مسیر سنتز اسید آمینه آرژینین و یک عامل رونویسی که در القای هورمون‌های مربوط به سیگنال‌های دفاعی نقش دارند ممکن است در مقاومت به بیماری آسکوکیتا در وارسته‌های مورد مطالعه نقش داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: آسکوکیتا بلایت، نخود، گلیکان‌ها، KEGG، پرولین، RNA-Seq

### مقدمه

نخود (*Cicer arietinum* L.) رتبه چهارم را در بین حبوبات از نظر سطح زیر کشت در جهان دارد (18) و یکی از منابع اصلی تامین پروتئین در کشورهای در حال توسعه است که حتی در خاک‌های ضعیف ماسه‌ای رشد می‌کند. نخود در کشور ما، هم از نظر سطح زیر کشت و هم از نظر میزان تولید مقام اول را در بین حبوبات دارا است. ولی در برخی مناطق، سطح زیر کشت آن رفته رفته کاهش یافته است و حتی در برخی مناطق زراعت آن منسوخ شده است. طبق آمار آمارنامه کشاورزی سال 94-95 سطح زیر کشت نخود در ایران 500189 هکتار و تولید سالیانه آن 271575 تن می‌باشد که در نتیجه، متوسط عملکرد آن تقریباً 0/54 تن در هکتار است. این درحالی است که متوسط عملکرد آن در جهان طبق گزارش فائو 0/81 تن در هکتار است (8).

نخود در طول دوره رشد با تنش‌های زیستی و غیرزیستی مختلفی درگیر است. سوختگی آسکوکیتایی، *Ascochyta blight* ناشی از قارچ *Ascochyta rabiei* Pass. (Labr.) (تلومورف، *Didymella rabiei* v. Arx. syn. *Mycosphaerella rabiei* Kovachevski) یکی از مخرب‌ترین تنش‌های زیستی کاهنده عملکرد این محصول می‌باشد (1). این قارچ در بسیاری از کشورهای جهان از جمله منطقه مدیترانه، خاورمیانه و شبه‌قاره هند شناخته شده است (15). این بیماری در صورت فراهم‌بودن شرایط محیطی مطلوب کاهش عملکرد محصول را سبب می‌شود (19).

آنالیزهای بیان ژن (Gene expression analysis) ابزار قدرتمندی است که در بسیاری از زمینه‌های بیولوژی و دارویی استفاده می‌شود. از کاربردهای آنالیز بیان ژن می‌توان به مواردی مانند تعیین نمایه ترانسکریپتوم و سطوح بیان ژن، امتزاج ژن‌ها، چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی یا SNP، عناصر تکراری، وقایع اتصال جایگزین، پیدا کردن اسیدهای ریبونوکلئیک غیررمزگر، بهبود تفسیر ژنی، پیدا کردن اکسون‌های ژنی، ژنها و ترانسکریپت‌های جدید، پیدا کردن ترانسکریپت‌های در جهت مخالف، نواحی غیرترجمه‌شونده یا UTR، کدون‌های آغازگر جایگزین رونویسی، کاتالوگ‌های ژن‌های بیان‌شده اشاره نمود. (14). اصلاح برای دستیابی به ارقام مقاوم مهم‌ترین روش برای مقابله با بیماری آسکوکیتا است و بررسی الگوی بیان ژن‌ها و مشخص کردن ژن‌های مقاوم به بیماری در این راستا انجام می‌گیرد. روش‌های Omics مختلفی برای کشف مکانیزم مولکولی برهمکنش گیاه و پاتوژن استفاده شده است.

روش‌های بررسی بیان ژن در دو گروه قرار می‌گیرد که گروه اول شامل تعدادی از روش‌هاست که هدف آنها بررسی بیان یک ژن خاص است مانند هیبریدیزاسیون نورترن، ribonuclease protection assay و real-time RT-PCR و گروه دوم شامل روش‌هایی است که بیان تعداد زیادی از ژن‌ها را بررسی می‌کنند مانند آرایه‌های DNA و SAGE. علی‌رغم مزیت‌هایی که این روش‌ها در بررسی ترانسکریپتوم دارد استفاده از آن به‌علت برخی از معایب آن محدود شده

بذر رقم بیونج (شاهد)، CM-88 و C-727 درون گلدان‌های جداگانه حاوی ماسه کشت شدند. یک هفته پس از جوانه‌زدن، گیاهچه‌های یکنواخت و هم‌اندازه انتخاب شدند و درون گلدان‌های با قطر 11 سانتی‌متر حاوی مخلوط خاک: ماسه به نسبت 3:1 در عمق 2/5 سانتی‌متری به تعداد سه گیاهچه کشت گردید. این گلدان‌ها در شرایط گلخانه در 15-22 درجه سانتی‌گراد (تناوب دمای شب و روز) نگهداری شدند تا به رشد لازم جهت مایه‌کوبی برسند. همزمان با این عملیات از حاشیه‌کشت‌های تک اسپور قارچ، قطعاتی به قطر 0/5 سانتی‌متر جدا و در لوله حاوی 10 میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و خوب به‌هم‌زده شد تا سوسپانسیون غلیظی از جدایه مذکور به‌دست آید. سپس این سوسپانسیون را در سطح تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA پخش نموده و آب اضافی آنرا خالی شد و به‌مدت 12 روز در شرایط دما و نور آزمایشگاه قرار داده شدند. پس از ظهور پیکنیدیهای قارچ به فراوانی بر روی محیط کشت، سوسپانسیون اسپور قارچ با اضافه‌نمودن آب مقطر سترون و مالش آرام سوزن سترون بر روی سطح محیط کشت تهیه شد. با استفاده از گلوله شمار مدرج، سوسپانسیون با رقت  $1 \times 10^5$  اسپور در میلی‌لیتر تهیه شد سپس گیاهچه‌های 14 روزه نخود با سوسپانسیون قارچ به‌طور یکنواخت تا مرحله ریزش اولین قطره از سطح برگ با استفاده از اسپری‌های دستی اسپورپاشی شدند. برای هر گلدان مقدار پنج میلی‌لیتر سوسپانسیون قارچ استفاده شد. قسمت‌های مختلف اسپری استفاده شده، پس از اسپورپاشی گلدان‌ها در محفظه‌ای با پوشش پلاستیکی در دمای 18-22 درجه سلسیوس و 12-14 ساعت نور طبیعی نگهداری شدند. رطوبت نسبی در زیر محفظه 95-100 درصد تامین گردید. در روز سوم پوشش پلاستیکی برداشته شد و دما و رطوبت طبیعی در اختیار گیاه قرار داده شد (16).

#### نمونه‌گیری، استخراج RNA و توالی‌یابی

نمونه‌گیری از سه تکرار بیولوژیکی هر وارسته، هفت روز بعد از آلودگی و از برگ‌های اول گیاه نخود انجام گرفت. بعد از نمونه‌گیری، برگ‌ها در یک فویل آلومینیومی پیچیده شده و بلافاصله به تانک حاوی ازت مایع منتقل گردید. سپس نمونه‌ها تا زمان استخراج RNA در دمای منفی 20 درجه نگهداری شد. به‌منظور بالا بردن دقت آزمایش و صرفه‌جویی در هزینه‌ها سه نمونه بیولوژیک هر وارسته ادغام شده و استخراج RNA کل از دو نمونه با کیت استخراج Hangzhou Bioer (کشور چین، شرکت Hangzhou Bioer Technology) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده آن انجام گرفت. برای تشخیص عدم وجود شکستگی و سالم‌بودن، مقدار RNA یکسانی از RNA استخراج‌شده روی ژل آگارز 1/5 درصد الکتروفورز شد. نمونه‌های RNA با کیفیت بسیار خوب، دو یا بیش از دو باند واضح rRNA و بدون شکستگی را روی ژل نشان دادند (20). سپس کیفیت و کمیت نمونه‌ها توسط شرکت BJI (<https://www.bgi.com/global/>) تأیید شده و توسط همین شرکت با Illumina HighSeq 2500، به‌طول 150 bp، به‌صورت paired end توالی‌یابی شد و کتابخانه RNA

است. روشی که در حال حاضر رایج است تکنیک RNA-Seq است. تکنیک RNA-Seq روش مدرن، کارآمد و ارزان نسبت به روش‌های قدیمی است که برای بررسی الگوی بیان ژن‌ها استفاده می‌شود. روش RNA-Seq به‌طور خلاصه شامل دو مرحله آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی است. بخش آزمایشگاهی شامل استخراج RNA، قطعه‌قطعه کردن RNA، سنتز cDNA، دو رشته‌ای، اتصال آدپتور، انتخاب طول مناسب و تکثیر با PCR، توالی‌یابی و ایجاد خوانش‌ها است. مرحله بیوانفورماتیکی شامل کنترل کیفیت خوانش‌ها، نقشه‌یابی خوانش‌ها، اندازه‌گیری کمی، نرمال کردن، آنالیز تفرق بیان و آنالیز مسیر (Pathway analysis) است (21). روش RNA-Seq قابلیت تشخیص رونوشت‌های با بیان پایین را دارد و بر انتخاب پیش‌تعیین شده پروب تکیه ندارد و علاوه بر تشخیص افتراقی ژن‌ها در تشخیص رونوشت‌ها غیرژنی، شناسایی رونوشت‌های جدید، ایزوفرم‌ها و محل برهم‌کنش پروتئین و RNA روش توانمندی است (7). موتاسیون القایی روش مهمی در اصلاح گیاهان زراعی است. مطالعات متعددی بر روی گیاهان موتانت و والدی با روش RNA-Seq به‌منظور کشف مسیرهای جدید بیولوژیکی و ژن‌های هدف انجام گرفته است (23، 28).

در این مطالعه، آنالیز بررسی الگوی بیان ژن‌ها در رقم CM-88 و C-727 با استفاده از RNA-Seq انجام گرفت. وارسته CM-88 مقاوم به بیماری آسکوکیتا بوده و از پرتوتابی وارسته C-727 به‌وجود آمده است این در حالیست که شباهت ژنتیکی بین CM-88 و C-727، 94 % می‌باشد (12). هدف از این تحقیق، کشف ژن‌هایی بود که در مقاومت به بیماری آسکوکیتا در نخود نقش دارند به‌همین‌منظور الگوی بیان ژن‌های دو رقم والدی و موتانت نخود به‌منظور یافتن مسیرها و ژن‌های موثر در مقاومت به بیماری آسکوکیتا مقایسه شدند.

#### مواد و روش‌ها

##### تهیه مواد آزمایش

آزمایش در سال 1394 در دانشکده تولید گیاهی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، روی دو وارسته CM-88 و C-727 انجام گرفت. ایزوله قارچ آسکوکیتا از بخش بیماری‌شناسی مرکز تحقیقات کشاورزی ورامین تهیه گردید.

بذور نخود از موسسه کشاورزی و زیست‌شناسی هسته‌ای کشور پاکستان با رعایت قوانین قرنطینه نباتی برای واردات بذر انجام گرفت. وارسته موتانت CM-88 به‌طور رسمی در سال 1994 در کشور پاکستان به ثبت رسید. رقم CM-88 در اثر پرتوتابی رقم والدی C-727 با پرتو گاما با مقدار تشعشع 100 گری به وجود آمد (<https://mvd.iaea.org>). مهم‌ترین صفات بهبود یافته وارسته‌های موتانت، مقاومت به آسکوکیتا، بیماری فوزاریوم و عملکرد بالا بود (<https://mvd.iaea.org>).

##### روش آزمایش

آزمایش با سه تکرار و یک رقم شاهد (رقم حساس به بیماری آسکوکیتا) در طرح کاملاً تصادفی، اجرا گردید. ابتدا

کدهای شناسایی آنتالوژی ژن‌هایی که تفرق بیان داشتند با استفاده از UniProt (<https://www.uniprot.org>) به دست آمد.

### آنالیز مسیر

آنالیز مسیر با ابزار command line، genescf در محیط لینوکس یوبونتو انجام گرفت.

### نتایج و بحث

فایل ترانسکریپتوم در فرمت FastQ (fq) ایجاد شد و تقریباً 97 میلیون خوانش برای واریته CM-88 و تقریباً 86 میلیون خوانش برای واریته C-727 به صورت paired end توالی‌یابی شد. براساس نتایج آنالیز FastQC محتوای GC برابر 40 و طول همه خوانش‌ها 150 bp به دست آمد. براساس نتایج FastQC، شاخص Phred که مهم‌ترین شاخص در برآورد کیفیت داده‌های توالی‌یابی است در سطح 40 بود که نشان داد بیش از 99 درصد داده‌ها کیفیت تعریف شده را داشتند. نقشه‌یابی با ژنوم رفرنسی که از پایگاه داده NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=cic+arietinum>) er+arietinum دانلود شده بود انجام گرفت. 82848250 خوانش از CM-88 و 72346680 خوانش از C-727 با ژنوم رفرنس نقشه‌یابی شدند که به ترتیب 85 و 84 درصد از کل خوانش‌های واریته CM-88 و C-727 را تشکیل می‌داد.

کل، عاری از rRNA تهیه گردید (depleted RNA rRNA sequences library).

### آنالیز RNA-Seq

کنترل کیفی داده‌ها به منظور حذف بازهای که کیفیت پایین دارند با نرم‌افزار FASTQC (V0.11.3) انجام شد. آنالیز داده‌های RNA-Seq با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench نسخه 11 انجام گرفت. توالی‌های پیرایش شده و فیلتر شده با ژنوم رفرنسی که از پایگاه داده NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=cic+arietinum>) دانلود شده بود نقشه‌یابی شد.

آنالیز RNA-Seq با تنظیمات از پیش تعریف شده CLC شامل عدم تطابق، 3 حذف، 2، و اضافه 3 ارزش گذاری شد. توالی‌هایی که در 50 درصد طول خود، 80 درصد با رفرنس تطابق داشتند در هم‌ریف‌سازی نقشه‌برداری استفاده شدند. سپس تفرق بیان به دست آمده و نتایج با آزمون کال (Kal's test) مورد ارزیابی آماری قرار گرفت. به منظور به دست آوردن عوامل ژنتیکی مقاومت به بیماری و یا حساسیت به آن در دو رقم موتانت و والدی به ترتیب CM-88 و C-727، الگوی بیان CM-88 نسبت به C-727 بررسی شد و ژن‌های با LFC (Log2 fold change) کمتر از دو حذف گردید. نمودار Venn با استفاده از پایگاه آنالیز <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> رسم گردید.

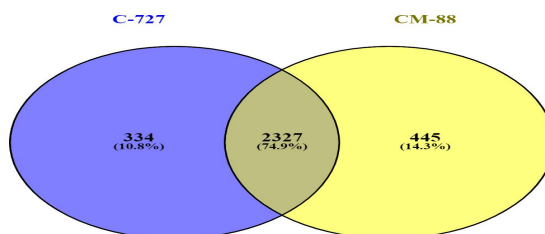
جدول 1- نتایج حاصل از توالی‌یابی، کنترل کیفی داده‌های خام و نقشه‌یابی ترانسکریپتوم

Table 1. The results of sequencing, the row data quality control and the mapping of the transcriptome

نمونه	تعداد خوانش‌ها	خوانش‌های فیلتر شده	خوانش‌های نقشه‌یابی شده	درصد خوانش‌های نقشه‌یابی شده
CM-88	97468529	97468529	82848250	85
C-727	86127000	86127000	72346680	84
کل	183595529	183595529	155194930	
میانگین	917977645	917977645	77597465	84,5

CM-88 نسبت به C-727 کاهش بیان و 1560 ژن افزایش بیان داشتند. 445 ژن، اختصاص به رقم CM-88 داشته و 334 ژن اختصاصاً در رقم C-727 بیان گردید (شکل 1).

از شاخص RPKM (reads per kilobase permillion) برای مقایسه بیان ژن‌ها در دو واریته استفاده شد. در مجموع 3106 ژن با بیان افتراقی مشخص شد که 1546 ژن در



شکل 1- نمودار Venn بیان ژن‌های افتراقی مشترک و اختصاصی دو واریته CM-88 و C-727

Figure 1. The Venn diagram of the common and specific differential genes expression of the two varieties, CM-88 and C-727

برای مشخص کردن مسیرهای زیستی فعال در نخود در شرایط آلودگی به بیماری آسکوکیتا، 3106 ژن که بیان افتراقی داشتند با 133 رفرنسی که برای نخود در KEGG موجود است، نقشه‌یابی شدند که از بین آنها 1285 ژن در 122 مسیر زیستی KEGG قرار گرفتند. از این 1285 ژن، 627 ژن در CM-88 نسبت به C-727 کاهش بیان داشته و 607 ژن افزایش بیان داشتند.

نتایج تحقیقات دیاس و همکاران تایید کرد که اسید آسکوربیک پیش‌ماده اصلی اگزالیک اسید در گیاه کاکائو در شرایط آلودگی به قارچ *Moniliophthora perniciosa* است (6). اگزالیک اسید با تولید  $H_2O_2$  از رشد پاتوژن بیوتروف جلوگیری کرده و از پیشروی مراحل کلون‌سازی و آلودگی در گیاه به‌وسیله قارچ ممانعت به‌عمل می‌آورد.

نتایج تحقیقات دیاس و همکاران تایید کرد که اسید آسکوربیک پیش‌ماده اصلی اگزالیک اسید در گیاه کاکائو در شرایط آلودگی به قارچ *Moniliophthora perniciosa* است (6). اگزالیک اسید با تولید  $H_2O_2$  از رشد پاتوژن بیوتروف جلوگیری کرده و از پیشروی مراحل کلون‌سازی و آلودگی در گیاه به‌وسیله قارچ ممانعت به‌عمل می‌آورد. ونگ و همکاران به این نتیجه رسیدند که آسکوربات و آلدرات (Ascorbate and aldarate metabolism) در مقاومت به فوزاریوم اسکروتینیایی در ذرت نقش دارند (24). کاتای و همکاران به اهمیت آسکوربیک اسید در مقاومت لوبیا به بیماری قارچی *Uromyces phaseoli* پی برده و در ضمن پیشنهاد کردند که مقاومت به این بیماری به‌میزان مصرف 1-methylascorbigen و به‌فاصله زمانی پیش تیمار تا زمان آلودگی بستگی دارد. اخیراً تحقیقات بسیاری پیشنهاد دادند که اسید آسکوربیک در فعالیت اکسیژنازهایی که پروتئین‌های شامل هیدروکسیل پرولین و هورمون‌ها را در گیاه تنظیم می‌کنند به‌عنوان کوفاکتور عمل می‌کند (2). همین‌طور کانکلین و بارت قبلاً به این نتیجه رسیده بودند که اسید آسکوربیک در ساخته‌شدن اسید آسبیزیک، جیبرلین، اتیلن به‌عنوان کوفاکتور عمل می‌کند (4).

مسیر سنتز آلدرات و آسکوربات از مسیرهای فعال در شرایط این آزمایش بود که 10 ژنی که تفرق بیان داشتند در این مسیر شرکت کردند در بین این مجموعه ژنی، ژن LOC101502106 که پروتئین *aldehyde dehydrogenase family 3 member H1-like* را رمز می‌کند بیان بسیار بالایی در رقم CM-88 نسبت به وارسته C-727 دارد. با توجه به آنالیز KEGG احتمال فعال‌بودن مسیر آلدرات و آسکوربات (cam00053) در حین درگیری سیستم ایمنی و بیماری داخل گیاه وجود دارد.

ترکیبات گلیکان‌ها نقش‌های متفاوتی را در سلول به‌خود می‌گیرند. مواتت‌هایی که در آنها ژن‌های حفاظت‌شده مربوط به مسیر سنتز گلیکان‌ها جهش یافته‌اند، نشان دادند که در این مواتت‌ها بیوسنتز سلولز متوقف شده و در شکل‌گیری ساختارهای پروتئینی به‌علت عدم تاخوردگی، اختلال ایجاد شد که این کمبود باعث حساسیت شدید به شوری گردید (9). خی و همکاران در آزمایش خود بر روی کدو نشان داد که در کدوهای مقاوم به فوزاریوم تجمع گلیکان‌ها در دیواره سلولی بسیار بیشتر از کدوهای حساس است (27) در تحقیق حاضر نتایج آنالیز KEGG و بررسی الگوی تفرق بیان ژن‌ها نشان داد که در رقم CM-88 ژن LOC101493707 که در مسیر بیوسنتز گلیکان‌ها نقش دارد، پروتئین UDP-N-acetylglucosamine transferase subunit ALG14 homolog را رمز می‌کند و سطح بیان بسیار بالایی

برای پروتئین پیش‌ماده ضروری رشد گیاه در بسیاری از زیستگاه‌های روی زمین است، زیرا مقدار زیادی نیتروژن برای تولید اسیدهای نوکلئیک و پروتئین مورد نیاز است. از میان 21 اسید آمینه پروتئین‌زا، آرژنین دارای بالاترین نسبت نیتروژن به کربن است که بهترین فرم ذخیره نیتروژن آلی است. تنها مسیر سنتز آرژنین در گیاه، در کلروپلاست و با کمک اورنیتین پیشنهاد شده است. سرعت سنتز آرژنین مطابق با وضعیت کلی تغذیه تنظیم شده است. ظاهراً، آرژنین یک پیش‌ماده برای اکسید نیتریک (NO) است، اگرچه مکانیزم مولکولی تولید NO از آرژنین در گیاهان بالاتر روشن نشده است. در مقابل، تبدیل آرژنین به پلی‌آمین‌ها به خوبی مستند شده است و در برخی از گونه‌های گیاهی نیز اورنیتین می‌تواند به‌عنوان یک پیش‌ماده برای پلی‌آمین‌ها عمل کند. هر دو NO و پلی‌آمین‌ها نقش مهمی در تنظیم فرایندهای رشد و همچنین پاسخ به استرس زیستی و زیست‌محیطی بازی می‌کنند. بنابراین قابل تصور است که کاتابولیسم آرژنین از یک‌سو برای ذخیره نیتروژن، از سوی دیگر ممکن است برای تقویت مکانیسم‌های رشد و دفاع در برابر استرس استفاده شود (26). علاوه‌براین نقش آرژنین به‌عنوان جایگزین گلوتامات برای بیوسنتز پرولین هنوز مورد بحث است. پرولین مولکول کوچکی است که به‌شدت در آب حلال است و بنابراین با غلظت‌های بالا در سیتوزول می‌تواند حضور داشته باشد (25). این اسمولیت از طریق تنظیم فشار اسمزی، سم‌زدایی ROS، حفظ سلامت دیواره سلولی و حفظ نسبت آنزیم به پروتئین به گیاه کمک می‌کند تا با شرایط استرس مقابله کند. علاوه‌بر اسمولیت، به‌عنوان کلات‌کننده فلزات و آنتی‌اکسیدانت در طی واکنش دفاعی عمل می‌کند به‌طوری که محلول پاشی گیاه با آن در غلظت پایین باعث افزایش مقاومت گیاه به استرس می‌شود (5). در شرایط حمله بیماری، پرولین در تنظیم مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول نقش دارد (17). در این آزمایش ژن LOC101511406 که پروتئین *alcohol dehydrogenase-like 4* را رمز می‌کند در وارسته CM-88 بیان بالایی نسبت به وارسته C-727 دارد و در مسیر سنتز آرژنین و پرولین نقش دارد.

ژن LOC101494292 پروتئین *transcription factor TGA4-like* را کد می‌کند که با توجه به نتایج آنالیز مسیر KEGG در مسیر *Plant hormone signal transduction* نقش دارد و در وارسته CM-88 بیان بسیار بالایی نسبت به C-727 دارد. در تنباکو و همین‌طور در آراییدوپسیس تالیانا، بسیاری از ژن‌های گلوکاتایون *S-transferase* و گلوکوزیل ترانسفراز با SA، 4-D، JA و  $H_2O_2$  القاء می‌شوند (22,3).

مسیر سنتز آلدرات و آسکوربات از مسیرهای فعال در شرایط این آزمایش بود که 10 ژنی که تفرق بیان داشتند در این مسیر شرکت کردند در بین این مجموعه ژنی، ژن LOC101502106 که پروتئین *aldehyde dehydrogenase family 3 member H1-like* را رمز می‌کند بیان بسیار بالایی در رقم CM-88 نسبت به وارسته C-727 دارد. با توجه به آنالیز KEGG احتمال فعال‌بودن مسیر آلدرات و آسکوربات (cam00053) در حین درگیری سیستم ایمنی و بیماری داخل گیاه وجود دارد.

ترکیبات گلیکان‌ها نقش‌های متفاوتی را در سلول به‌خود می‌گیرند. مواتت‌هایی که در آنها ژن‌های حفاظت‌شده مربوط به مسیر سنتز گلیکان‌ها جهش یافته‌اند، نشان دادند که در این مواتت‌ها بیوسنتز سلولز متوقف شده و در شکل‌گیری ساختارهای پروتئینی به‌علت عدم تاخوردگی، اختلال ایجاد شد که این کمبود باعث حساسیت شدید به شوری گردید (9). خی و همکاران در آزمایش خود بر روی کدو نشان داد که در کدوهای مقاوم به فوزاریوم تجمع گلیکان‌ها در دیواره سلولی بسیار بیشتر از کدوهای حساس است (27) در تحقیق حاضر نتایج آنالیز KEGG و بررسی الگوی تفرق بیان ژن‌ها نشان داد که در رقم CM-88 ژن LOC101493707 که در مسیر بیوسنتز گلیکان‌ها نقش دارد، پروتئین UDP-N-acetylglucosamine transferase subunit ALG14 homolog را رمز می‌کند و سطح بیان بسیار بالایی

القاء توسط SA نیاز به کلاس دوم TGA دارد. در ریشه، فعال سازی دفاع وابسته به اتیلن و جاسمونیک اسید نقش دارد (29). TGA4 به عنوان تنظیم کننده منفی این پاسخ عمل می کند (10). علاوه بر القای دفاع وابسته به سالسیلیک این فاکتور در

جدول 2- اطلاعات مهم ژن هایی که در CM-88 بیان بیشتری نسبت به C-727 دارند.

Table 2- Main information of the genes which have more expression in CM-88 rather than C-727

ژن	نام پروتئین	KEGG pathway	Fold change
LOC101494292	transcription factor TGA4-like	Plant_hormone_signal_transduction	32
LOC101511406	alcohol dehydrogenase-like 4	Arginine_and_proline_metabolism	38
LOC101493707	UDP-N-acetylglucosamine transferase subunit ALG14 homolog	N-Glycan_biosynthesis	153

تشریح و قدردانی (Biology (NIAB) پاکستان و مهندس داریوش شهریاری از مرکز تحقیقات ورامین در اختیار تیم تحقیق قرار داده شد و در اینجا از مساعدت ایشان تشکر و قدردانی می کنم.

بذر مورد نیاز و ایزوله قارچ آسکوکیتا به ترتیب، توسط دکتر محمودشاه از موسسه هسته ای کشاورزی و زیست شناسی ( Nuclear Institute for Agriculture and

## منابع

- Ahmad, F., P.M. Gaur and J. Croser. 2005. Chickpea (*Cicer arietinum* L.). Genetic resources, chromosome engineering and crop improvement-grain legumes, Taylor and Francis, Inc. Bosa Roca, United States, 390 pp.
- Arrigoni, O. and M.C. De Tullio. 2000. The role of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions. *Journal of Plant Physiology*, 157(5): 481-488.
- Chen, W. and K.B. Singh. 1999. The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the Arabidopsis GST6 promoter is mediated in part by an ocs element. *The Plant Journal*, 19(6): 667-677.
- Conklin, P.L. and C. Barth. 2004. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens and the onset of senescence. *Plant, Cell and Environment*, 27(8): 959-970.
- Dar, M.I., M.I. Naikoo, F. Rehman, F. Naushin and F.A. Khan. 2016. Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development. In *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies*. Springer, New Delhi, pp: 155-166.
- Dias, C.V., J.S. Mendes, A.C. Dos Santos, C.P. Pirovani, A. da Silva Gesteira, F. Micheli, K.P. Gramacho, J. Hammerstone, P. Mazzafera and J.C. de Mattos Cascardo. 2011. Hydrogen peroxide formation in cacao tissues infected by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(8): 917-922.
- Dündar, F., L. Skrabanek and P. Zumbo. 2015. Introduction to differential gene expression analysis using RNA-seq. *Applied Bioinformatics Core/Weill Cornell Medical College*, pp: 1-67.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2019. FAOSTAT Statistical Database of the United Nation Food and Agriculture Organization (FAO) statistical division. Rome.
- Farid, A., F.G. Malinovsky, C. Veit, J. Schoberer, C. Zipfel and R. Strasser. 2013. Specialized roles of the conserved subunit OST3/6 of the oligosaccharyl transferase complex in innate immunity and tolerance to abiotic stresses. *Plant Physiology*, 162(1): 24-38.
- Foley, R.C. and K.B. Singh. 2004. TGA5 acts as a positive and TGA4 acts as a negative regulator of ocs element activity in Arabidopsis roots in response to defense signals. *FEBS letters*, 563(1-3): 141-145.
- Gao, X.D., H. Tachikawa, T. Sato, Y. Jigami and N. Dean. 2005. Alg14 recruits Alg13 to the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum to form a novel bipartite UDP-N-acetylglucosamine transferase required for the second step of N-linked glycosylation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(43): 36254-36262.
- Hameed, A., A. Saddiqa, S. Nadeem., N. Iqbal., B.M. Atta and T.M. Shah. 2012. Genotypic variability and mutant identification in *Cicer arietinum* L. by seed storage protein profiling. *Pak. J. Bot*, 44(4): 1303-1310.
- Kátay, G., E. Tyihak and E. Kátay. 2011. Effect of ascorbigen and 1'-methylascorbigen on disease resistance of bean plants to *Uromyces phaseoli*. *Natural product communications*, 6(5): 611-615.
- Jazayeri, S.M., R.A.H. Mauricio and L.M. Melgarejo. 2012. RNA-Seq: advantages, disadvantages, problems and applications. 4th Iranian Conference on Bioinformatics, Tehran, Iran, 181 pp.
- Low, P.S. 1985. Molecular basis of the biological compatibility of nature's osmolytes. In *Transport processes, ionic and osmoregulation*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp: 469-477.

16. Pande, S., M. Sharma., P.M. Gaur and C.L.L. Gowda. 2010. Host Plant Resistance to Ascochyta Blight of Chickpea. Information Bulletin. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
17. Qamar, A., K. Mysore and M. Senthil-Kumar. 2015. Role of proline and pyrroline-5-carboxylate metabolism in plant defense against invading pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 6: 503.
18. Randhawa, N., J. Kaur, S. Singh and I. Singh. 2014. Growth and yield in chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes in response to water stress. *African Journal of Agricultural Research*, 9(11): 982-992.
19. Reddy, M.V. and K.B. Singh. 1990. Management of Ascochyta blight of chickpea through integration of host plant tolerance and foliar spraying of chlorothalonil. *Indian Journal of Plant Protection*, 18(1): 65-69.
20. Tattersall, E.A., A. Ergul, F. AlKayal, L. DeLuc, J.C. Cushman and G.R. Cramer. 2005. Comparison of methods for isolating high-quality RNA from leaves of grapevine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(4): 400-406.
21. Upasani, M.L., B.M. Limaye, G.S. Gurjar, S.M. Kasibhatla, R.R. Joshi, N.Y. Kadoo and V.S. Gupta. 2017. Chickpea-Fusarium oxysporum interaction transcriptome reveals differential modulation of plant defense strategies. *Scientific Reports*, 7(1): 7746.
22. Wagner, U., R. Edwards, D.P. Dixon and F. Mauch. 2002. Probing the diversity of the Arabidopsis glutathione S-transferase gene family. *Plant Molecular Biology*, 49(5): 515-532.
23. Wang, W., Y. Dai, M. Wang, W. Yang and D. Zhao. 2019. Transcriptome Dynamics of Double Recessive Mutant, o2o2o16o16, Reveals the Transcriptional Mechanisms in the Increase of Its Lysine and Tryptophan Content in Maize. *Genes*, 10(4): 316.
24. Wang, Y., Z. Zhou, J. Gao, Y. Wu, Z. Xia, H. Zhang and J. Wu. 2016. The mechanisms of maize resistance to *Fusarium verticillioides* by comprehensive analysis of RNA-seq data. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1654.
25. Wei, G.U.O. and A.H. Shirsat. 2006. Extensin overexpression in Arabidopsis limits pathogen invasiveness. *Molecular Plant Pathology*, 7(6): 579-592.
26. Winter, G., C.D. Todd, M. Trovato, G. Forlani and D. Funck. 2015. Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6: 534.
27. Xie, D., L. Ma, J. Šamaj and C. Xu. 2011. Immunohistochemical analysis of cell wall hydroxyproline-rich glycoproteins in the roots of resistant and susceptible wax gourd cultivars in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Benincasae* infection and fusaric acid treatment. *Plant Cell Reports*, 30(8): 1555-1569.
28. Xiong, H., H. Guo, Y. Xie, L. Zhao, J. Gu, S. Zhao, J. Li and L. Liu. 2017. RNAseq analysis reveals pathways and candidate genes associated with salinity tolerance in a spaceflight-induced wheat mutant. *Scientific reports*, 7(1): 2731.
29. Zander, M., S. La Camera, O. Lamotte, J.P. Métraux and C. Gatz. 2010. *Arabidopsis thaliana* class-II TGA transcription factors are essential activators of jasmonic acid/ethylene-induced defense responses. *The Plant Journal*, 61(2): 200-210.

## Identification of Pathways and Candidate Genes Associated with Resistance to Ascochyta Blight in a Mutant Chickpea Variety using RNA-Seq Analysis

Masoumeh Sabokbari Abarghan<sup>1</sup>, Khalil Zaynali Nezhad<sup>2</sup>, Esmail Ebrahimie<sup>3</sup>  
and Hasan Soltanloo<sup>4</sup>

1 and 4- Ph.D. Student and Associate Professor of respectively, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2- Assistant Professor of respectively, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

3- Associate Professor of Institute of Biotechnology, Shiraz University, Shiraz, Iran

Received: April 20, 2019

Accepted: August 6, 2019

### Abstract

Chickpea is involved in biotic and abiotic stresses during its growing period. *Ascochyta* blight is the most significant fungal disease that causes main yield deflection in chickpea. Breeding to obtain resistant cultivars is the most important method for coping with *Ascochyta* blight. Evaluation of the pattern of gene expression and identification of resistant genes using RNA-Seq technique provides valuable information for breeders. In present research the transcriptome profile of a C-727 as sensitive variety and CM-88 as a resistance variety were investigated. RNA extracted from the leaves of the plants under *Ascochyta* infection. following by preparation of depleted RNA library from rRNA. Then, sequencing was performed by illumina genome analyzer deep sequencing. An approximately 84653468 (C-727) and 97400784 (CM-88) raw reads were generated. In total, 3106 genes were determined by differential expression. From 3106 genes in CM-88, 1546 genes showed the decrease in expression and 1560 genes showed the increase in expression than C-727. After KEGG analysis, 1285 genes were recognized in 122 biological pathways. from 1285 genes, 627 and 607 genes were down and up regulated in CM-88. The results of the KEGG analysis and the pattern of expression of the genes showed that the N-Glycan biosynthesis pathway and the pathway for the synthesis of amino acid arginine and a transcription factor that induced hormones related to defense signals was enriched with enhanced expression genes consequently they may play a role in resistance to *ascochyta* in the varieties studied.

**Keywords:** Ascochyta blight, Chickpea, Glycans, KEGG, Proline, RNA-Seq