

## «مقاله پژوهشی»

## شناسایی ژن‌های دخیل در استقرار رابطه انگلی در گل جالیز مصری بر پایه تجزیه و تحلیل داده‌های بیان ژن

راحیل دولت‌آبادی<sup>۱</sup>، هاجر شایسته<sup>۱</sup>، امین میرشمسی کاخکی<sup>۲</sup>، محمد زارع مهرجردی<sup>۳</sup>، علیرضا سیفی<sup>۲\*</sup>

۱. دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲. استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۳. استادیار، مجتمع آموزش عالی شیروان، دانشگاه بجنورد، شیروان، شیروان، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۸)

### Identification of candidate genes involved in parasitic relationship in *Orobanche aegyptiaca* based on gene expression data

Rahil Dowlatabadi<sup>1</sup>, Hajar Shayesteh<sup>1</sup>, Amin Mirshamsi Kakhki<sup>2</sup>, Mohammad Zare Mehrjerdi<sup>3</sup>, Alireza Seifi<sup>2\*</sup>

1. Ph.D. Candidate, Biotechnology and Plant Breeding Department, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2. Assistant Professor, Biotechnology and Plant Breeding Department, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3. Assistant Professor, Higher Education Complex of Shirvan, University of Bojnord, Shirvan, Iran.

(Received: Sep.10, 2021 - Accepted: Dec. 19, 2021)

#### Abstract

Broomrape (*Orobanche aegyptica*) is a notorious parasitic plant that cause significant production loss. Here we report analysis of publicly available RNA-seq data for broomrape, coupled with experimental verification of part of the results. After quality control of raw illumine reads, qualified reads were mapped against *Orobanche* transcriptome. Differential gene expression analysis, performed by using DESeq package, identified 391 differentially expressed genes between seed imbibition and haustorium attachment stages. The expression of orthologs of these genes in close relatives of *Orobanche*, which are parasitic, hemi- or non-parasitic, was investigated. From 391 identified genes, 87 genes showed high levels of expression in parasitic relatives and not in non-parasitic ones. Based on these analyses the 87 genes were considered as candidate genes involved in establishment of parasitic interaction between *Orobanche* and its host. The expression of nine of these genes were checked experimentally in flower tissues of *Orobanche* and in tissues sampled from the attachment site on the host root. The expression of Or2094, which a putative serine-carboxy peptidase, was detected only in the attachment site, supporting the role of this gene in establishment of the parasitic interaction. The results of this work will pave the way for future genetic engineering projects to use host-induced gene silencing strategy to enhance resistance to *Orobanche* in host crop plants.

**Keywords:** Serine carboxypeptidase, effector, RNAi, haustorium

E-mail: arseifi@um.ac.ir

#### چکیده

گل جالیز گیاه انگلی است که باعث کاهش قابل توجهی در تولید محصولات زراعی می‌شود و کنترل آن نیز در شرایط مزرعه دشوار است. در این مطالعه تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-seq موجود در NCBI همراه با تایید آزمایشگاهی بخشی از نتایج حاصل گزارش می‌شود. پس از ارزیابی کیفیت خوانش‌های خام آلوئینا، خوانش‌های با کیفیت قابل قبول روی ترنسکرپتوم گل جالیز نقشه‌یابی شدند. پس از آنالیز بیان ژن با استفاده از نرم افزار DESeq، ۳۹۱ ژن دارای بیان متفاوت در مرحله آنبوشی بذر گل جالیز و در مراحل اتصال گل جالیز به ریشه میزبان شناسایی شد. بیان اورتولوگ این ژن‌ها در خویشاوندان نزدیک گل جالیز، که غیر انگلی یا نیمه انگلی هستند، نیز بررسی شد. از بین ۳۹۱ ژنی که بین مرحله آنبوشی و اتصال به میزبان در گل جالیز تفاوت بیان معنی داری داشتند، ۸۷ ژن در خویشاوند انگلی گل جالیز نیز بیان بالایی در زمان اتصال به میزبان داشتند، در حالی که این ژن‌ها در خویشاوند غیر انگلی بیان نمی‌شدند. بر این اساس این ۸۷ ژن به‌عنوان ژن‌های کاندید دخیل در استقرار رابطه انگلی با میزبان در نظر گرفته شدند. در ادامه الگوی بیان ژن از این ژن‌های کاندید انتخابی در بافت رویشی، گل، و بافت محل اتصال گل جالیز به گوجه‌فرنگی بررسی شد. نتایج نشان داد که ژن کدکننده سرین کربوکسی‌پپتیداز الگوی بیان مورد انتظار برای ژن‌های دخیل در ایجاد رابطه انگلی را دارد به نحوی که تنها در بافت محل اتصال به میزبان بیان می‌شود. نتایج این مطالعه می‌تواند برای اهداف مهندسی ژنتیک گوجه‌فرنگی برای ایجاد مقاومت به گل جالیز از طریق خاموشی ژن در میزبان مورد استفاده قرار گیرد.

**واژه‌های کلیدی:** سرین کربوکسی‌پپتیداز، افکتور، RNAi، هوستوریوم.

\* نویسنده مسئول: علیرضا سیفی

### مقدمه

بیش از ۴۵۰۰ گونه گیاهی گلدار، در ۲۰ خانواده، گیاهان انگل هستند که از این تعداد ۴۱۰۰ گونه نیمه‌انگل و ۳۹۰ گونه انگل کامل هستند (Heide-Jørgensen, 2008). این گونه‌ها شامل گل‌جالیز (*Orobanchae spp.*)، علف جادوگر (*Striga spp.*) و سس (*Cuscuta spp.*) هستند که از نظر تحقیقات بنیادی و کاربردی اهمیت دارند. گیاهان انگلی مانند *O. aegyptiaca* باعث کاهش قابل توجه عملکرد در محصولات زراعی خانواده سولاناسه و بقولات در نقاط مختلف جهان به‌ویژه در خاورمیانه می‌شوند (Musselman, 1980). این گونه‌ها همچنین سیستم‌های مدل عالی برای پاسخ به سوالات اساسی در مورد مکانیسم‌های انتقال افقی ژن، انتقال ماکرومولکول‌ها بین دو موجود زنده، و تکامل گیاهان انگلی از گیاهان فتوسنتز کننده هستند. انتقال افقی ژن (Horizontal Gene transfer: HGT) بین گیاهان انگل و میزبان در طول مسیر تکامل همزمان آنها اتفاق افتاده‌است. برای نمونه در یک مطالعه مشخص شده‌است که گل‌جالیز و سس ژن استریکتوسیدین سنتاز، که یک ژن خاص گیاهان خانواده براسیکاسه است، را از طریق HGT کسب کرده‌اند (Zhang et al., 2014).

وجود بیش از ۱۰ نوع mRNA مختلف گوجه‌فرنگی در گیاهان سس متصل به گوجه‌فرنگی، و نه در میزبان‌های دیگر، آشکار شده‌است که نشان می‌دهد این mRNAها از گوجه‌فرنگی به سس انتقال یافته‌اند (Roney et al., 2007). داده‌های توالی‌یابی نسل نوین حاکی است که ۲۴ تا ۴۱ درصد ژنوم میتوکندریایی در گیاهان انگل خانواده *Rafflesiaceae* احتمالاً از گیاهان میزبان دریافت شده‌اند (Xi et al., 2013). به نظر می‌رسد که HGT یک مسیر دوطرفه است چرا که تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی پیشنهاد می‌کند که

برخی ژن‌های میتوکندریایی بارهنگ (*Plantago spp.*) احتمالاً از گونه‌های مختلف گیاه انگل سس کسب شده‌اند (Mower et al., 2010). انتقال افقی ژن بین گیاهان انگل و میزبان الهام‌بخش پژوهشگران برای طراحی روش‌هایی بر پایه خاموشی ژن‌های انگل از طریق خاموشی ژن در میزبان (Host-Induced Gene silencing: HIGS)، برای مهندسی ژنتیک گیاهان زراعی به هدف افزایش مقاومت به قارچ‌های بیماری‌زا و گیاهان انگل بوده‌است. برای مثال، خاموشی ژن قارچ فوزاریوم (*Fusarium graminearum*) از طریق میزبان قارچ، آرابیدوپسیس و جو، باعث افزایش مقاومت این دو میزبان به قارچ شده‌است (Koch et al., 2013). روش HIGS برای افزایش مقاومت به قارچ ورتیسیلیوم در گوجه‌فرنگی (Song & Thomma, 2018) و پنبه (Zhang et al., 2016)، و افزایش مقاومت به سفیدک دروغین در کاهو با موفقیت استفاده شده‌است (Govindarajulu et al., 2015).

جالب توجه است که قابلیت به‌کارگیری روش HIGS برای افزایش مقاومت به گل‌جالیز نیز نشان داده شده‌است. در یک مطالعه خاموشی موقت ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدهای گل‌جالیز در توتون باعث جلوگیری از اتصال گل‌جالیز به توتون شده‌است (Aly et al., 2014). برای طراحی HIGS دقیق و پایدار درک عمیق‌تری از اساس مولکولی استقرار گل‌جالیز روی میزبان مورد نیاز است. میان‌کنش مولکولی (Molecular Interactions) باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها، اوومایست‌ها، حشرات گیاه‌خوار و حشرات مکنده با گیاهان میزبان به‌طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته‌است و لذا برخی از مکانیسم‌های مولکولی کنترل‌کننده این میان‌کنش‌ها شناخته شده‌است. بر پایه مدل پذیرفته شده فعلی گیرنده‌های غشایی گیاه

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه از داده‌ای RNA-seq موجود در پرتال پروژه ژنوم گیاهان انگلی (<http://ppgp.huck.psu.edu>) استفاده شد (هم‌اکنون این پرتال از دسترس خارج شده است و لذا داده‌های خام مورد استفاده در این مقاله از طریق نویسنده مسوول قابل دسترسی است). این داده‌ها شامل خوانش‌های الومینا (Illumina) دوطرفه (paired) به طول ۱۰۰ باز، از ۱۰ مرحله نموی مختلف در گل جالیز، از مرحله آبنوشی بذر تا مرحله گلدهی، است (Yang *et al.*, 2015). ما در این مطالعه داده‌های مربوط به شش مرحله اول، از آبنوشی بذر تا اتصال گل جالیز به بافت آوندی میزبان (جدول ۱)، را بررسی کردیم.

جدول ۱. مراحل نموی مختلف گل جالیز که داده‌های RNA-seq آن در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفته است.

نام کتابخانه	مرحله رشدی گل جالیز
OrAe0G	آبنوشی بذر گل جالیز
OrAe1G	ریشه‌چه بذور گل جالیز جوانه‌زده در پاسخ به محرک GR24
OrAe2G	ریشه‌چه بذور جوانه‌زده در تماس با ریشه میزبان
OrAe3G	تشکیل هوستوریوم و اتصال به ریشه میزبان
OrAe41G	اتصال هوستوریوم به بافت آوندی میزبان
OrAe42G	مرحله تشکیل زگیل

## ارزیابی کیفیت و پیرایش خوانش‌های خام

کیفیت خوانش‌های خام با به‌کارگیری نرم‌افزار FASTQC (Andrews, 2017) بررسی شد و سپس پیرایش خوانش‌ها با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) صورت گرفت. به‌طور خلاصه ۱۳ نوکلئوتید ابتدایی هر خوانش حذف شد و خوانش‌هایی که در آن‌ها میانگین شاخص کیفیت Phred هر ۴ نوکلئوتید متوالی کمتر از ۲۰ بود نیز فیلتر شدند. توالی آداپتورهای الومینا از خوانش‌های خام حذف شد و در پایان قطعاتی که طول آن‌ها حداقل ۲۰ نوکلئوتید بود برای ادامه آنالیزها حفظ شدند. جدول

موسوم به PRRها مولکول‌های ویژه میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا که با نام PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) شناخته می‌شوند را شناسایی می‌کنند و این شناسایی باعث القای پاسخ ایمنی در گیاه می‌شود. همچنین گیرنده‌های درون سلولی، که اغلب از خانواده پروتئینی Nucleotide-Binding Leucine- (NB-LRR Rich Repeats) هستند، پروتئین‌های ترشحی میکروارگانیزم‌ها، که به آن‌ها افکتور اطلاق می‌شود را شناسایی کرده و پاسخ ایمنی قویتری ایجاد می‌کنند (Jones & Dangl, 2006).

در سال‌های اخیر میان‌کنش مولکولی بین گیاهان انگلی و میزبان آن‌ها نیز مورد توجه پژوهشگران زیست‌شناسی گیاهی و کشاورزی قرار گرفته است. یک مطالعه ژنومی جامع در مراحل مختلف رشد و نموی، بر روی چهار گونه گیاهی انگل از خانواده *Orobanchaceae* از جمله *O. aegyptiaca*، یک گیاه انگل کامل فاقد توان فتوسنتز، *Striga hermonthica*، یک گیاه نیمه‌انگل اجباری، *Triphysaria versicolor*، یک گیاه انگل اختیاری و *Lindenbergia philippensis*، یک گیاه غیر انگلی، انجام شده است (Yang *et al.*, 2015). در این مطالعه تکامل ژنومی در این گیاهان انگل مورد بررسی قرار گرفت.

هدف از مطالعه حاضر تجزیه و تحلیل الگوی بیان ژن در گل جالیز مصری در مراحل اولیه ایجاد رابطه انگلی، به‌منظور درک بهتر میان‌کنش مولکولی گل جالیز با گیاهان میزبان و یافتن ژن‌های کلیدی دخیل در استقرار رابطه انگلی، به‌منظور استفاده از آن‌ها در آزمایش‌های بعدی HIGS، بود. ما ژن‌هایی را که در مرحله اتصال گل جالیز به میزبان افزایش چشمگیر بیان داشتند شناسایی کردیم و در مورد نقش احتمالی برخی از این ژن‌ها بحث می‌کنیم.

## ۲، درصد خوانش‌های باقیمانده پس از اعمال پیرایش‌های فوق را نشان می‌دهد.

جدول ۲. درصد خوانش‌های باقی‌مانده پس از پیرایش در هر کتابخانه الومینا.

نام کتابخانه الومینا	تعداد خوانش‌های خام	تعداد خوانش‌های باقی‌مانده پس از پیرایش	
		باقی‌مانده پس از پیرایش	درصد خوانش‌های باقی‌مانده پس از پیرایش
OrAe0G	۱۵۵۸۵۴۰۰	۱۴۷۷۴۵۲۵	۹۵
OrAe1G	۲۶۰۵۸۵۷۱	۲۰۲۰۱۷۵۶	۷۷
OrAe2G	۲۵۹۳۵۵۱۴	۲۴۰۰۲۱۱۸	۹۲
OrAe3G	۱۸۲۵۳۷۴۰	۱۷۱۸۴۸۲۸	۹۴
OrAe41G	۲۷۹۹۳۹۸۲	۲۳۸۰۶۸۷۳	۸۵
OrAe42G	۲۰۷۶۶۶۸۵	۱۹۹۳۰۴۵۴	۹۶

نرم‌افزار BioEdit برای BLAST روی ترنسکریپتوم *Triphysaria versicolor*، *Striga hermonthica* و *Lindenbergia philippensis* مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور E value برابر با ۱۰ در نظر گرفته شد. توالی هدفی که کمترین مقدار E value را داشت به‌عنوان اورتولوگ ژن مورد نظر در هر کدام از این سه گونه در نظر گرفته شد.

## بررسی هستی‌شناسی ژن‌ها

داده‌های هستی‌شناسی (Gene Ontology: GO) ژن‌ها از پرتال پروژه ژنوم گیاهان انگل دریافت شد. برای به‌روزرسانی GO، تجزیه و تحلیل blast2go نیز انجام شد. پیش‌بینی پپتید سیگنال با استفاده از ابزار SignalP-5.0 انجام شد (Petersen et al., 2011).

## طراحی آغازگر

ایزوفرم‌های مختلف مربوط به هر ژن هم‌ردیف شدند و نواحی حفاظت‌شده بین ایزوفرم‌ها مشخص شد. آغازگرها بر اساس این نواحی حفاظت‌شده با به‌کارگیری نرم‌افزار برخط OligoPerfect طراحی شدند. توالی و ویژگی‌های آغازگرهای طراحی شده در جدول ۳ خلاصه شده‌است.

نقشه‌یابی خوانش‌ها روی ترنسکریپتوم گل‌جالیز خوانش‌های پیرایش شده با به‌کارگیری نرم‌افزار BWA (Li & Durbin, 2009) روی ترنسکریپتوم گل‌جالیز (Yang et al., 2015) نقشه‌یابی شدند. این ترنسکریپتوم حاوی ۱۲۹۴۵۰ ترنسکرپت با طول متوسط ۶۴۳/۴۳ باز و میانه ۱۰۱۰ باز است. بر پایه نتایج نقشه‌یابی، جدول تعداد خوانش‌های نقشه‌یابی شده با استفاده از ابزار sam2counts (<https://github.com/vsbuffalo/sam2counts/blob/master/sam2counts.py>) تهیه شد.

## شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت

برای آنالیز بیان ژن از نرم‌افزار DESeq (Anders & Huber, 2010) استفاده شد. تعداد خوانش‌های نقشه‌یابی‌شده در مرحله آبنوشی (مرحله OrAe0G) و مرحل اتصال به میزبان (مرحله OrAe3G) با هم مقایسه شد و ژن‌هایی که در این دو مرحله بیش از ۴ برابر تفاوت بیان داشتند به‌عنوان ژن‌های با بیان متفاوت در نظر گرفته شدند. برای این ژن‌ها نقشه حرارتی با استفاده از نرم‌افزار heatmap.2 (Warnes et al., 2015) در فضای R ترسیم شد.

## شناسایی اورتولوگ‌های در گیاهان خویشاوند انگل

## و نیمه انگل

توالی نوکلئوتیدی ژن‌های مورد نظر با به‌کارگیری

بررسی بیان ژن‌ها در آزمایشگاه  
RNA کل از گل‌ها یا بافت محل‌های اتصال  
گل‌جالیز با میزبان، گوجه‌فرنگی و خیار، استخراج شد.

جدول ۳. لیست آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش.

نام آغازگر	توالی آغازگر (5'-3')	Tm (°C)	اندازه قطعه قابل تکثیر (جفت باز)
Or_206	F: TGGTGTAGCAGCCACTTGAC R: AGACAGCTCTCGGGATTTC	59.9 59.9	233
Or_548	F: TTTACAACCTTCGGGGCATC R: CCCATCAGTGGATTCTTGCT	59.9 60	216
Or_3391	F: TCTCAGCAAAAACGCTGATG R: ATCAAAAAGCCGGATGTGTTC	60 59	190
Or_239	F: TAGCCGATATCCCAAACCTG R: GCCAGAAAGCTTTCCAAGT	59 60	294
Or_1635	F: ATTGTTGCACGAGTGCTCAG R: AAAAGGGTCATGGTCTGGTG	60 59	218
Or_3903	F: CAAAAGTGCAGGAGACACAGA R: AATTCTCTTGGCTGGACACC	60 60	193
Or_424	F: TGAGACAGCCAAAGGAGGAG R: AGCGCATATAGTAACGCATC	60 58	120
Or_2094	F: CGAGAGATCACCGTAGCACA R: GCTTTGGACATGGGTCTGAT	60 59	249
Or_5328	F: TTACATCCTCGGGCAAGTTC R: AAACGGCCTAACACCAACTG	60 60	159
Or_Actin	F: ATCCAACCCCTTGTGTGTTGA R: GGGCCTCGTCACCTACATAA	60 59	163

هوستوریوم اولین مرحله در استقرار رابطه انگلی است، ما آنالیزهای خود را بر روی ژن‌هایی که در این مرحله بیان بالایی داشتند معطوف کردیم. برای این منظور بیان ژن‌ها در دو مرحله آبنوشی بذر (مرحله OrAe0G در جدول ۱) و مرحله اتصال به میزبان (مرحله OrAe3G در جدول ۱) مقایسه شد. نتیجه این مقایسات نشان داد که ۳۹۱ ژن بین این دو مرحله تفاوت بیان داشتند به طوری که میزان تغییر بیان (محاسبه شده بر اساس لگاریتم در مبنای ۲) بالاتر از ۴ بود. همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود الگوی بیان این ژن‌ها در مراحل قبل از اتصال به میزبان (OrAe0G, OrAe1G, OrAe2G) و مراحل بعد از اتصال به میزبان (OrAe3G, OrAe41G, OrAe42G) کاملاً متفاوت است.

با این فرض که ژن‌های دخیل در رابطه انگلی احتمالاً در گیاهان انگل مختلف مشترک هستند (Yang et al., 2015)، اورتولوگ این ۳۹۱ ژن در گیاهان نیمه‌انگل علف جادوگر (Striga)

پس از انتقال بوته‌های گوجه‌فرنگی و خیار آلوده به گل‌جالیز به آزمایشگاه، خاک اطراف ریشه بوته‌ها با دقت شسته شد و بخش‌هایی از ریشه که گل‌جالیز روی آن مستقر شده بود به‌عنوان نمونه بافت محل اتصال گل‌جالیز در نظر گرفته شد. از گل‌های گل‌جالیز نیز نمونه‌برداری شد. بافت‌ها در ازت مایع منجمد شدند و تا زمان استخراج RNA در دمای منفی ۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از تیمار با *DNase* برای حذف آلودگی DNA، حدود ۵۰۰ نانوگرم از RNA برای سنتز cDNA با به‌کارگیری کیت Viva cDNA Synthesis ساخت شرکت Vivantis (شماره کاتالوگ CDSK01) استفاده شد. cDNAها ۲۰ بار با آب مقطر رقیق شده و یک میکرولیتر از آن برای PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده قرار گرفتند.

## نتایج و بحث

شناسایی ژن‌های کاندید در استقرار رابطه انگلی از آنجا که مرحله اتصال گل‌جالیز به میزبان و تشکیل

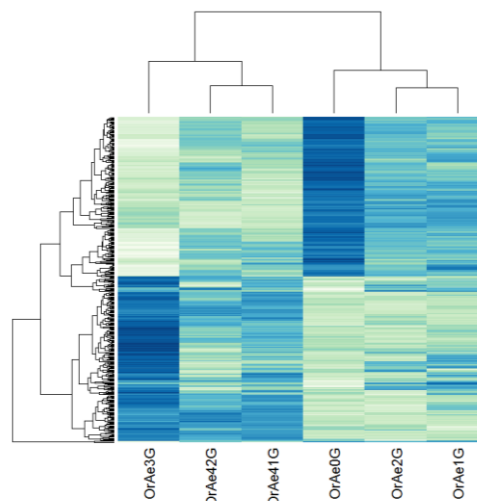
دخیل در مسیر سیگنالینگ هورمون براسینواستروئید، آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره سلولی، ناقل‌های لیپیدها، تنظیم‌کننده‌های رشد و تمایز سلولی در بین این ژن‌های کاندید مشاهده شدند.

پروتئازهای مختلفی در لیست ژن‌های کاندید (جدول ۴) مشاهده می‌شوند. ژن Or2094، که احتمالاً کد کننده یک سرین‌کربوکسی‌پپتیداز است، یکی از این پروتئازها است که بیان آن به‌طور خاص در بافت محل اتصال گل‌جالیز به ریشه میزبان تایید شد (شکل ۲). مطالعات در آراییدوپسیس نشان داده‌است که همولوگ این ژن در آراییدوپسیس، *BSRI*، در تنظیم مراحل اولیه انتقال سیگنال براسینواستروئیدها نقش کلیدی دارد (Jia Li et al., 2001). بیش بیان *BSRI* در آراییدوپسیس باعث افزایش تشکیل ریشه‌های جانبی شده‌است (Deng et al., 2017). همچنین همولوگ این ژن در شبدر (*Medicago trunculata*) در رابطه همزیستی شبدر با مایکوریزا نقش دارد (Liu et al., 2003). جالب است که Or239 نیز در مسیر انتقال سیگنال براسینواستروئیدها نقش دارد که اهمیت این مسیر در میان‌کنش گل‌جالیز با میزبان را نشان می‌دهد. با توجه به اهمیت دست‌ورزی در رشد و نمو ریشه میزبان توسط گل‌جالیز و نقش براسینواستروئیدها در این فرآیندها، ژن Or2094 و Or239 می‌توانند کاندیدهای مناسبی برای پروژه‌های HIGS مطرح باشد.

### شناسایی ژن‌های کاندید کد کننده افکتورهای ترش‌چی

در مرحله بعد در بین ۵۵ ژنی که فاقد همولوژی با ژن‌های شناخته شده هستند، وجود ژن‌های کاندید افکتوری بررسی شد. افکتورها پروتئین‌های کوچک ترش‌چی هستند که معمولاً شباهتی با ژن‌های شناخته شده ندارند (Hogenhout, Van der Hoorn, Terauchi, & Kamoun, 2009; Win

*Triphysaria hermonthica*)، گیاه نیمه انگل *Lindenbergia versicolor* و گیاه غیر انگل *philippensis* جستجو شدند. بر این اساس ۸۳ ژن که در مرحله اتصال گل‌جالیز به میزبان بیان بالایی داشتند، در دو گونه انگل و نیمه‌انگل نیز مشاهده شدند ولی در گیاه غیر انگل ژن مشابهی برای آن‌ها وجود نداشت. لذا احتمالاً این ۸۳ ژن در فرآیند استقرار رابطه انگلی بین گل‌جالیز و میزبان نقش دارند.



شکل ۱. نقشه حرارتی بیان ۳۹۱ ژن کاندید دخیل در استقرار رابطه انگلی در گل‌جالیز. رنگ آبی تیره نشان‌دهنده بیان بالا و رنگ سبز روشن نشان‌دهنده بیان پایین ژن‌ها است. شش مرحله نموی گل‌جالیز در محور افقی مشخص شده است. تفاوت معنی‌داری در الگوی بیان ژن بین مرحله آبنوشی (OrAe0G) و اتصال به میزبان (OrAe3G) وجود دارد.

### هستی شناسی ژن‌های کاندید شناسایی شده

برای بررسی بیشتر ۸۳ ژن کاندید، تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی این ژن‌ها با به‌کارگیری ابزار blast2go انجام شد. نتایج نشان داد که ۲۸ ژن از این ژن‌ها همولوگ‌هایی در سایر گیاهان دارند، ولی ۵۵ ژن همولوژی معنی‌داری با ژن‌های شناخته شده ندارند (جدول ۴). همانگونه که در جدول ۴ مشخص شده‌است انواع مختلفی از پروتئازها، پروتئین‌های

et al., 2012). بر پایه این سه ویژگی، ۱۸ ژن به‌عنوان ژن کاندید افکتوری شناسایی شد (جدول ۵). که احتمال نقش افکتوری آن‌ها را افزایش می‌دهد. در این بین ۵ ژن در گیاهان انگل S. جدول ۴. اطلاعات هستی‌شناسی ژن‌های کاندید دخیل در استقرار رابطه انگلی گل‌جالیز با میزبان.

ژن	میزان تغییر بیان (لگاریتم در مبنای ۲)	P value	کارکرد احتمالی	E value
Or548	12.61	1.6E-09	Cell wll-membrane linking protein	5.76E-13
Or239	10.0	1.44E-07	Brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1 (BAK1/SERK3)	9.50E-40
Or2463	9.5	8.37E-06	Aspartic proteinase nepenthesin-2	7.50E-18
Or2094	9.3	3.87E-07	Serine carboxypeptidase-like	1.90E-119
Or2914	9.2	9.22E-06	CO2-response secreted protease	7.00E-25
Or2614	8.8	4.60E-06	Clavata3 ESR-related protein	1.70E-04
Or16083	8.7	7.83E-05	endo-1,3-beta-D-glucosidase	5.20E-18
Or12736	7.9	9.65E-05	LRR receptor-like serine threonine-protein kinase	3.20E-04
Or5556	7.9	6.98E-06	Basic blue protein	2.10E-13
Or12962	7.8	9.98E-04	Aspartyl protease family protein	1.70E-09
Or15802	7.7	6.85E-04	Serine carboxypeptidase-like	5.30E-119
Or13998	7.7	7.29E-04	Protein radialis-like	4.20E-27
Or6444	7.4428	0.00021	pectinesterase inhibitor	1.00E-08
Or206	7.2596	0.0001	PAR1 protein	2.00E-10
Or13426	6.5	1.39E-03	endo-1,3-beta-D-glucosidase	1.30E-21
Or10771	6.2	4.62E-04	Cysteine-rich repeat secretory protein	2.60E-38
Or6640	5.937	0.00027	Plant basic secretory protein (BSP) family protein	2.00E-53
Or212	5.8	2.52E-04	Brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1 (Bak1/SERK3)	3.70E-09
Or13325	5.4	2.26E-03	endo-1,3-beta-D-glucosidase	6.30E-14
Or3583	5.3	8.72E-04	Cysteine-rich repeat secretory protein	9.50E-26
Or2663	5.1	8.97E-04	Somatic embryogenesis receptor kinase 2 (Ser2)	1.20E-24
Or1834	4.9	1.34E-03	Defensin J1-2	5.20E-21
Or13234	4.8	3.79E-03	Germin-like protein	5.30E-81
Or9568	4.7	3.93E-03	Aspartyl protease family protein	1.60E-106
Or264	4.6	3.15E-03	Lipid-transfer protein (DIR1)	7.50E-15
Or1253	4.4	2.93E-03	Protease do-like	1.90E-12
Or1244	4.3	4.07E-03	Cysteine-rich repeat secretory protein	3.50E-45
Or1730	4.3	3.78E-03	Non-specific lipid-transfer protein	2.10E-06

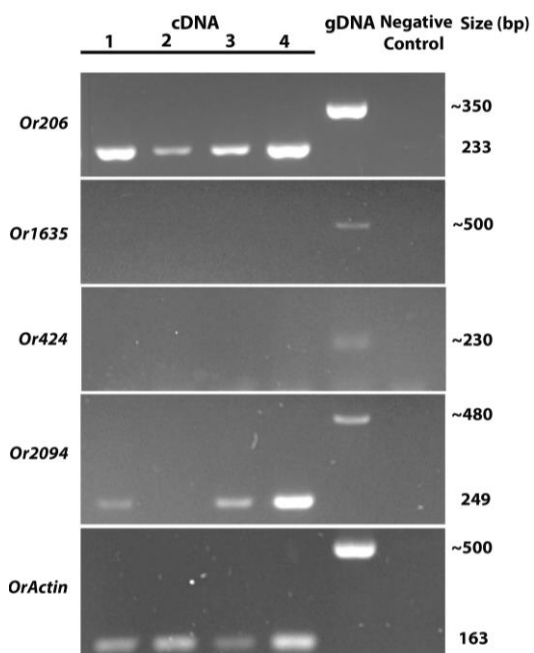
جدول ۵. لیست ژن‌های کاندید کد کننده افکتورهای گل‌جالیز.

ژن	میزان تغییر بیان (لگاریتم در مبنای ۲)	P value	اورتولوگ در دو گیاه انگل دیگر	E value
Or3391.1	11.04	2.00E-07	StHeBC3_59410.1	6E-17
Or424.5	10.17	1.38E-06	StHeBC3_59596.1	7E-61
Or3903.1	9.38	6.73E-06	StHeBC3_60249.1	2E-106
Or8228.1	9.33	1.36E-05		
Or3800.1	9.28	1.16E-06		
Or5328.1	9.11	1.84E-06		
Or12648.1	7.91	6.55E-04		
Or6404.1	7.72	4.49E-04		
Or8982.1	7.48	1.15E-03		
Or6444.1	7.44	2.10E-04		
Or4916.4	7.37	8.13E-04		
Or13078.1	7.19	3.07E-03		
Or22343.1	7.12	3.92E-03	TrVeBC3_26344.1	4E-95
Or9996.1	6.37	1.57E-03		
Or7443.1	6.12	1.14E-03		
Or5472.1	6.11	1.75E-04		
Or687.1	5.25	6.56E-04	TrVeBC3_33320.1	9E-56
Or794.1	4.79	2.26E-03		

PAMP در گل‌جالیز، گونه *O. ramosa*، شناسایی شده‌است که می‌تواند پاسخ‌های ایمنی را در آرابیدوپسیس فعال کند (El-Maarouf-Bouteau

اینکه آیا سیستم ایمنی گیاه در میان‌کنش گل‌جالیز با میزبان نقش دارد یکی از سؤالات جالب در زیست‌شناسی مولکولی گیاهی است. یک مولکول

محل اتصال بیان داشت در حالی که Or206 در همه بافت‌های بررسی شده بیان شد (شکل ۲).



شکل ۲. بیان چهار ژن کاندید به همراه ژن خانه‌دار اکتین (OrActin) در بافت گل و بافت محل اتصال گل‌جالیز به گوجه‌فرنگی و خیار. شماره ۱ بررسی بیان در بافت محل اتصال گل‌جالیز به ریشه خیار، شماره ۲ در بافت گل، و شماره‌های ۳ و ۴ در بافت محل اتصال گل‌جالیز به ریشه گوجه‌فرنگی را نشان می‌دهد. تکثیر روی DNA ژنومی (gDNA) و کنترل منفی (واکنش RT-PCR فاقد آنزیم رونوشت‌بردار معکوس)، و اندازه باند‌های تکثیر شده در شکل نشان داده شده است.

### سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد با شماره ۲/۳۳۸۰۴ انجام شده‌است.

### REFERENCES

Aly, R., Dubey, N. K., Yahyaa, M., Abu-Nassar, J., & Ibdah, M. (2014). Gene silencing of *CCD7* and *CCD8* in *Phelipanche aegyptiaca* by tobacco rattle virus system retarded the parasite development on the host. *Plant*

*Signaling & Behavior*, 9(8), e29376.  
Anders, S., & Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Nature Precedings*, 1-1.  
Andrews, S. (2017). FastQC: a quality

et al., 2008). کشف یک گیرنده PRR نیز در گوجه‌فرنگی که قادر به درک PAMP های گیاه انگل سبب است (Hegenauer et al., 2016)، این نوید را می‌دهد که احتمالاً شناسایی PAMP توسط PRR های گیاه میزبان، احتمالاً به همان نحوی که در میان‌کنش گیاه و میکروارگانیسم‌ها دیده می‌شود، وجود دارد. کشف یک پروتئین NB-LRR که باعث ایجاد مقاومت به علف‌جادوگر در نوعی لوبیا می‌شود (Jianxiong Li & Timko, 2009)، دخالت سیستم ایمنی میزبان در پاسخ مولکولی به گل‌جالیز را تقویت می‌کند. در پژوهش حاضر ژن‌هایی شناسایی شدند که بیان بالایی در بافت محل اتصال گل‌جالیز به میزبان دارند و شباهت معنی‌داری با ژن‌های شناخته‌شده ندارند. این پروتئین‌های کوچک ترشحی می‌توانند به عنوان افکتورهای کاندید گل‌جالیز مورد مطالعه بیشتر قرار گیرند.

### تایید بیان ژن‌های انتخابی در آزمایشگاه

پس از شناسایی ژن‌های کاندید دخیل در شکل‌گیری رابطه انگلی، ۴ ژن با کارکرد مشخص (از جدول ۴) و ۵ ژن با کارکرد نامشخص (از جدول ۵) انتخاب شدند و برای آن‌ها آغازگرهای اختصاصی طراحی شد. سپس بیان این ژن‌ها در بافت رویشی و گل و همچنین بافت محل اتصال گل‌جالیز به میزبان بررسی شد. هرچند برای پنج تا از این ژن‌ها بر روی DNA ژنومی باندی حاصل شد، با این حال فقط برای دو تا از آن‌ها باند مورد انتظار روی cDNA تکثیر شد. ژن Or2094 به‌طور خاص تنها در بافت



- control tool for high throughput sequence data. 2010.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Deng, Q., Wang, X., Zhang, D., Wang, X., Feng, C., & Xu, S. (2017). BRS1 function in facilitating lateral root emergence in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1549.
- El-Maarouf-Bouteau, H., Moreau, E., Errakhi, R., & Sallé, G. (2008). A diffusible signal from germinating *Orobanche ramosa* elicits early defense responses in suspension-cultured *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, 3(3), 189-193.
- Govindarajulu, M., Epstein, L., Wroblewski, T., & Michelmore, R. W. (2015). Host-induced gene silencing inhibits the biotrophic pathogen causing downy mildew of lettuce. *Plant Biotechnology Journal*, 13(7), 875-883.
- Hegenauer, V., Fürst, U., Kaiser, B., Smoker, M., Zipfel, C., Felix, G., ... . Albert, M. (2016). Detection of the plant parasite *Cuscuta reflexa* by a tomato cell surface receptor. *Science*, 353(6298), 478-481.
- Heide-Jørgensen, H. (2008). *Parasitic flowering plants*: Brill.
- Hogenhout, S. A., Van der Hoorn, R. A., Terauchi, R., & Kamoun, S. (2009). Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(2), 115-122.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323.
- Koch, A., Kumar, N., Weber, L., Keller, H., Imani, J., & Kogel, K.-H. (2013). Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 $\alpha$ -demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(48), 19324-19329.
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754-1760.
- Li, J., Lease, K. A., Tax, F. E., & Walker, J. C. (2001). BRS1, a serine carboxypeptidase, regulates BRI1 signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(10), 5916-5921.
- Li, J., & Timko, M. P. (2009). Gene-for-gene resistance in *Striga*-cowpea associations. *Science*, 325(5944), 1094-1094.
- Liu, J., Blaylock, L. A., Endre, G., Cho, J., Town, C. D., VandenBosch, K. A., & Harrison, M. J. (2003). Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Cell*, 15(9), 2106-2123.
- Mower, J.P., Stefanović, S., Hao, W., Gummow, J. S., Jain, K., Ahmed, D., & Palmer, J.D. (2010). Horizontal acquisition of multiple mitochondrial genes from a parasitic plant followed by gene conversion with host mitochondrial genes. *BMC Biology*, 8(1), 1-16.
- Musselman, L. J. (1980). The biology of *Striga*, *Orobanche*, and other root-parasitic weeds. *Annual Review of Phytopathology*, 18(1), 463-489.
- Petersen, T. N., Brunak, S., Von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), 785-786.
- Roney, J.K., Khatibi, P.A., & Westwood, J.H. (2007). Cross-species translocation of mRNA from host plants into the parasitic plant dodder. *Plant Physiology*, 143(2), 1037-1043.
- Song, Y., & Thomma, B. P. (2018). Host-induced gene silencing compromises *Verticillium* wilt in tomato and *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology*, 19(1), 77-89.

- Warnes, G. R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Liaw, W. H. A., Lumley, T.,... . Schwartz, M. (2015). gplots: Various R programming tools for plotting data.
- Win, J., Chaparro-Garcia, A., Belhaj, K., Saunders, D., Yoshida, K., Dong, S.,... . Hogenhout, S. (2012). *Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives*. Paper presented at the Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.
- Xi, Z., Wang, Y., Bradley, R. K., Sugumaran, M., Marx, C. J., Rest, J. S., & Davis, C. C. (2013). Massive mitochondrial gene transfer in a parasitic flowering plant clade. *PLoS Genetics*, 9(2), e1003265.
- Yang, Z., Wafula, E. K., Honaas, L. A., Zhang, H., Das, M., Fernandez-Aparicio, M.,... . Der, J. P. (2015). Comparative transcriptome analyses reveal core parasitism genes and suggest gene duplication and repurposing as sources of structural novelty. *Molecular Biology and Evolution*, 32(3), 767-790.
- Zhang, D., Qi, J., Yue, J., Huang, J., Sun, T., Li, S.,... . Wang, L. (2014). Root parasitic plant *Orobanchae aegyptiaca* and shoot parasitic plant *Cuscuta australis* obtained Brassicaceae-specific strictosidine synthase-like genes by horizontal gene transfer. *BMC Plant Biology*, 14(1), 1-14.
- Zhang, T., Jin, Y., Zhao, J.-H., Gao, F., Zhou, B.-J., Fang, Y.-Y., & Guo, H.-S. (2016). Host-induced gene silencing of the target gene in fungal cells confers effective resistance to the cotton wilt disease pathogen *Verticillium dahliae*. *Molecular Plant*, 9(6), 939-942.