اساس مولکولی برهمکنش بین افکتورهای بیمارگرهای قارچی با گیاهان میزبان
Molecular basis of interactions between fungal effectors and host plants

امیر میرزادی گوهری[۱] و فرزانه لک[۲*]

دریافت: ۱۴۰۲/۷/۱۳ پذیرش: ۱۴۰۲/۹/۸

چکیده

تعاملات مولکولی بین بیمارگرهای قارچی و گیاهان میزبان یک فرآیند بسیار پیچیده و دینامیک است که به دو صورت مختلف، پاسخ‌های سازگاری و ناسازگاری، بروز می‌نماید. در حالت سازگاری، گیاهان در نتیجه حمله بیمارگر به بیماری مبتلا می‌شوند؛ در مقابل، در حالت ناسازگاری، گیاهان پس از حمله بیمارگر از خود مقاومت نشان می‌دهند. یکی از جنبه‌های کلیدی در این برهمکنش‌ها، ترشح مولکول‌های پروتئینی کوچک توسط بیمارگرهای قارچی است. این مولکول‌های کوچک، معمولاً به‌عنوان افکتورها شناخته می‌شوند که طی فرگشت توسط بیمارگرهای قارچی بدست می‌آیند. این افکتورها نقش بسیار حیاتی در تغییر فیزیولوژی گیاهان میزبان و سرکوب پاسخ‌های دفاعی آنها ایفا می‌نمایند. این مقاله مروری به بررسی اساس ژنتیکی تعاملات مولکولی بین افکتورهای بیمارگرهای قارچی و گیاهان میزبان با تأکید بر پاتوسیستم متشکل از بیمارگر قارچی *Cladosporium fulvum* و گیاه گوجه‌فرنگی می‌پردازد. این بررسی می‌تواند به درک بهتر از نحوه ایجاد بیماری یا بروز مقاومت گیاهان میزبان در برابر بیمارگرهای قارچی کمک کرده و پایه‌ای جهت توسعه رویکردهای نوین در راستای کنترل بیماری‌های گیاهی را فراهم آورد.

واژگان کلیدی: افکتور، بیمارگرهای قارچی، نقش بیولوژیکی، تعاملات متقابل

مقدمه

بیمارگرهای قارچی گیاهی به دلیل تهدیدهایی که برای امنیت غذایی و کاهش عملکرد محصولات کشاورزی در سرتاسر جهان تحمیل می‌نمایند، مانند بیماری‌هایی از جمله زنگ‌ها، سیاهک‌ها و ..... از لحاظ اقتصادی مهم هستند. تخمین زده شده است که این بیماری‌ها تقریباً سالانه باعث کاهش ۱۰ درصد از تولیدات کشاورزی در جهان می‌شوند (Oerke, 2006). کشاورزان در جهت کاهش یا اجتناب از بیماری‌های‌قارچی گیاهی ناگزیر از استفاده از ارقام مقاوم و یا کاربرد متعدد قارچ‌کش‌ها علی‌رغم اثرات زیست‌محیطی منفی هستند. علاوه بر این، رویکردهای رایج تک کشتی، که در طی آن یک ژنوتیپ گیاهی در یک منطقه وسیع کشت و کار می‌شود، روند انتخاب ایزوله‌های قارچی که قادر به شکستن مقاومت در محصولات زراعی هستند را افزایش می‌دهد. این قبیل اقدامات کشاورزی نیاز به توسعه و معرفی ژن‌های مقاومت جدید به داخل محصولات کشاورزی، از طریق برنامه‌های اصلاح زراعی را افزایش می‌دهد (Strange *et al*., 2005؛ Lo Presti *et al*., 2015). سبک زندگی بیمارگرهای قارچی بسیار متنوع است و آن‌ها از رویکردهای منحصر به فردی در جهت تعامل با گیاهان میزبان استفاده می‌کنند. به‌عنوان مثال، قارچ‌های بیوتروف بیمارگرهایی هستند که زندگی‌شان به مواد غذایی کسب شده از یک سلول زنده وابسته است؛ به طوری‌که اگر سلول میزبان نابود شود، بیمارگر نیز از بین می‌رود. مهم‌ترین مثال‌ها در این مورد شامل اوومیست‌ها، عوامل ایجادکننده سفیدک‌های دروغی (به‌عنوان مثال گونه‌های مختلف بیمارگر شبه‌قارچی .*Peronspora* spp)، آسکومیست‌ها، عامل ایجادکننده سفیدک پودری (گونه‌های مختلف بیمارگر قارچی .*Blumeria* spp) و یا بازیدیومیست‌ها، عامل ایجادکننده زنگ‌ها (گونه‌های مختلف بیمارگر قارچی .*Puccinia* spp) هستند. این گونه بیمارگرهای بیوتروفی، به یک‌سری

۱ و ۲- به ترتیب استادیار و دانشجوی دکتری، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: farzaneh.lak@ut.ac.ir

ساختارهای تغذیه‌ای تخصص‌یافته به‌عنوان مثال اندام مکینه یا هاستوریوم جهت دریافت مواد غذایی از سلول میزبان وابسته هستند (Mendgen and Hahn, 2002؛ Mapuranga *et al*., 2022). در مقابل، قارچ‌های نکروترفی ابتدا با تولید توکسین و آنزیم‌های متنوع تخریب‌کننده دیواره سلولی، بافت میزبان را از بین برده و سپس از مواد غذایی آزاد شده استفاده می‌کنند و اغلب به‌عنوان بیمارگرهایی با دامنه میزبانی وسیع مانند بیمارگرهای قارچی *Botrytis cinerea* و *Sclerotinia sclerotiorum* توصیف شده‌اند (Van Kan, 2006). از طرف دیگر، بیمارگرهای همی‌بیوتروفی در ابتدای کلنیزاسیون گیاهی دارای رشد نکروتروفی بوده و سپس بعد از اتمام این دوره وارد یک فاز نکروتروفی می‌شوند. علی‌رغم تنوع موجود در بین سبک‌های زندگی، بیمارگرهای قارچی کلنیزه کننده گیاهان از طریق سیستم ایمنی ذاتی گیاهی تشخیص داده می‌شوند که این امر پاسخ‌های دفاعی گیاه میزبان را به دنبال دارد (Ghiasi Noei *et al*., 2022). حس و درک بیمارگرهای گیاهی توسط سیستم ایمنی گیاهان، پاسخ‌های سیستمیک و موضعی را تحریک می‌نماید که این امر امکان پاسخ‌های سریع و موضعی گیاه را در برابر حمله بیمارگرهای قارچی فراهم می‌نماید. در واقع سیستم ایمنی ذاتی گیاهان از دو لایه تشکیل شده است، که اساس آن بر این امر استوار است که تشخیص بیمارگرهای قارچی توسط گیرنده‌های پروتئینی گیاه منجر به فعال شدن واکنش‌های دفاعی در گیاه می‌شود (Mukhi *et al*., 2020).

سیستم ایمنی ذاتی گیاهان

اولین لایه دفاعی به دنبال برهمکنش بین الگوهای مولکولی همراه با بیمارگر (PAMP = Pathogen Molecular Pattern) و پروتئین‌های گیرنده‌ای به نام گیرنده‌های تشخیص الگویی (PRR = Pathogen Recognition Receptor) فعال می‌شود. مولکول‌های PAMP اجزای اصلی و حفاظت شده گروه‌های مختلفی از بیمارگرها بوده و یکی از شناخته شده‌ترین آنها، کیتین موجود در دیواره سلولی قارچ ها است که برای شناسایی این مولکول دو نوع گیرنده شبه‌کینازی از نوع LysM گزارش شده است. وجود این گیرنده‌ها و نقش مهم آن‌ها در تشخیص مولکول‌های کیتین در دو گیاه برنج و آرابیدوپسیس تأیید شده‌است (Yu *et al*., 1998). حس و درک مولکول‌های PAMP از طریق گیرنده‌های پروتئینی موجود در غشاء سلولی گیاه، منجر به فعال شدن اولین لایه دفاعی گیاه (PTI= PAMP-triggered Immunity) یا ایمنی تحریک شده مبتنی بر مولکول‌های PAMP می‌گردد. همانطور که قبلاً ذکر گردید، فعال شدن اولین لایه دفاعی گیاه (PTI) منجر به یکسری از پاسخ‌های دفاعی می‌شود. این پاسخ‌ها شامل فعال شدن ژن‌های درگیر در مسیرهای دفاعی از قبیل ژن‌های درگیر در تولید فیتوالکسین‌ها، ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی، ژن‌های درگیر در تولید هورمون‌های گیاهی مانند اسید سالیسیلیک، اسید جاسمونیک و اتیلن و افزایش ضخامت دیواره سلولی و رسوب کالوسی در محل آلودگی است. باید توجه داشت که اولین لایهٔ دفاعی، در واقع یک سطح از مقاومت پایه را در گیاه مورد حمله ایجاد می‌کند. این واکنش‌های دفاعی موجب ممانعت از پیشروی بیشتر بیمارگر در گیاه میزبان می‌شود، اما آشکارا رشد و تکثیر بیمارگر در داخل بافت‌های گیاهی ادامه می‌یابد. به عبارت دیگر، مقاومت حاصل از فعال شدن اولین لایهٔ دفاعی، یک نوع مقاومت کمی را در برابر انواع مختلفی از بیمارگرها به وجود می‌آورد (Hetmann and Kowalczyk, 2019). بعد از تشخیص بیمارگرها و فعال شدن اولین لایه دفاعی به‌وسیلهٔ گیاه، بیمارگرهای قارچی مولکول‌های پروتئینی دیگری تحت عنوان افکتورها را درجهت آلودگی و کلنیزاسیون بیشتر بافت‌های گیاهی تولید می‌نماید (Hetmann and Kowalczyk, 2019). امروزه، به‌صورت گسترده‌ای پذیرفته شده‌است که اغلب ژن‌های غیربیماری‌زای قارچی، فاکتورهای بیماری‌زایی تحت عنوان افکتورها را رمزگذاری می‌کنند (De Wit *et al*., 2009). طی فرگشت، گیاهان میزبان ژن‌هایی تحت عنوان ژن‌های مقاومت کسب می‌نمایند که نقش اصلی محصولات پروتئینی رمزگذاری شده توسط این ژن‌ها، حس و درک پروتئین‌های افکتوری می‌باشد.

زمانی که مقاومت پایه‌ای حاصل از فعال شدن اولین لایه دفاعی در گیاهان از طریق یک بیمارگر از بین می‌رود، گیاهان از طریق توسعه یک سیستم تشخیصی اختصاصی مبتنی بر درک پروتئین‌های افکتوری به این بیمارگر، واکنش نشان داده و در نهایت دومین لایه دفاعی گیاه، یا ایمنی تحریک شده مبتنی بر افکتور که منجر به پاسخ‌های دفاعی قوی و سریع در گیاهان می‌شود، روی می‌دهد. در دومین لایه دفاعی گیاهان، تشخیص اختصاصی افکتورها از طریق

گیرنده‌های داخل‌سلولی (محصولات پروتئینی رمزگذاری شده به‌وسیله ژن‌های مقاومت) رخ دهد (De Wit *et al*., 2009). با فعال شدن دومین لایه دفاعی گیاه، واکنش‌های دفاعی مشابه به آنچه که با فعال شدن اولین لایه دفاعی گیاه رخ می‌دهد، بوجود می‌آید؛ ولی این واکنش‌ها بسیار قوی، سریع و همراه با مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (PCD= Programmed Cell Death) می‌باشد. اساساً، پروتئین‌های افکتوری، فاکتورهای بیماری‌زایی هستند که با تغییر فیزیولوژی گیاه منجر به کلنیزاسیون بافت‌های گیاهی میزبان می‌شوند. اگر این فاکتورهای بیماری‌زایی توسط سیستم ایمنی گیاه حس و درک شوند، این مولکول‌های افکتوری را فاکتورهای غیربیماری‌زایی می‌نامند. به خوبی مستند شده‌است که تشخیص افکتورها به‌وسیله سیستم ایمنی ذاتی گیاه از مدل ژن برای ژن پیروی می‌نماید (Dodds, 2023). این مدل بیانگر این امر است که برای هر ژن غیربیماری‌زای غالب (*Avr*) در بیمارگر یک ژن مقاومت متناظر (*R*) در گیاه میزبان وجود دارد. تعاملات متقابل بین محصولات این ژن‌ها منجر به فعال‌سازی دومین لایه دفاعی گیاه میزبان می‌شود که در این حالت رشد و تکثیر بیمارگرهای بیوتروفی در بافت‌های گیاهی مورد حمله به‌طور کامل متوقف می‌گردد. این پاسخ‌های دفاعی معمولاً همراه با مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و یا واکنش فوق حساسیت (HR =Hypersensitivity reactions) می‌باشد. در دهه‌های اخیر، بسیاری از آسیب‌شناسان گیاهی در جستجوی مدارک مولکولی و بیوشیمیایی برای اثبات نظریه ژن برای ژن هستند. همسان‌سازی مولکولی اولین ژن غیربیماری‌زایی قارچی در سال ۱۹۹۱ و اولین ژن غیربیماری‌زایی اوومیست‌ها در سال ۲۰۰۴ انجام شد. طی ۲۰ سال اخیر ژن‌های غیربیماری‌زایی جدید متعددی همراه با تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی فعال شده در گیاهان که از مدل ژن برای ژن تبعیت می‌کنند، شناسایی شده‌اند؛ که این امر فهم و درک مولکولی نظریه ژن برای ژن را به صورت قابل‌توجهی افزایش داده است (Kema *et al*., 2018؛ Ghiasi Noei *et al*., 2022).

تشخیص بیمارگرها توسط سیستم ایمنی گیاه منجر به ایجاد تغییراتی در بیمارگرها می‌گردد که طی آن بیمارگرها از طریق ایجاد جهش یا از دست دادن پروتئین‌های افکتوری قبلی و یا از طریق توسعه افکتورهای جدیدی که می‌تواند دومین لایه دفاعی گیاه را سرکوب نمایند، خود را مجهز می‌کنند. در مقابل، گیاهان نیز، پروتئین‌های مقاومت جدیدی که تشخیص پروتئین‌های افکتوری جدید را امکان پذیر می‌کنند، توسعه می‌دهند (Hetmann and Kowalczk, 2019).

امروزه مشخص شده است که روابط مولکولی متقابل بین بیمارگرهای قارچی نکروتروف با گیاهان میزبان از مدل ژن برای ژن پیروی نمی‌نماید. اخیراً مدلی تحت عنوان مدل معکوس ژن برای ژن ارایه گردیده است که این تعاملات را به خوبی توصیف می‌نماید (Friesen *et al*., 2007). این مدل بیانگر این امر است که توکسین‌های انتخابی میزبانی (HST) با ماهیت پروتئینی به‌عنوان افکتور عمل نموده و در گیاهان حاوی ژن حساسیت متناظر باعث ایجاد نکروز یا مرگ سلولی می‌شوند. توکسین‌های انتخابی میزبانی در واقع افکتورهایی هستند که توسط تعدادی از بیمارگرهای قارچی نکروتروفی از جمله *Pyrenophora tritici-repentis* و *Parastagonospora nodorum* تولید می‌شوند و اغلب توانایی تولید بیماری را به بیمارگر اعطا می‌نمایند. اغلب بیماری‌های ایجاد شده توسط بیمارگرهایی که تولید توکسین میزبان اختصاصی (Host-selective Toxins) می‌کنند از مدل معکوس ژن برای ژن پیروی می نمایند، که در این حالت تولید توکسین توسط بیمارگر و حضور یک جایگاه ژنی منفرد در میزبان برای ایجاد بیماری و حساسیت میزبان به بیمارگر بر روی یک میزبان خاص عوامل تعیین‌کننده‌ای هستند (Friesen *et al*., 2007؛ Ciuffetti *et al*., 2010).

اهمیت افکتورها

صدها پروتئین کوچک، که به‌عنوان افکتور شناساسی شده‌اند، توسط بیمارگرهای گیاهی در طی کلنیزاسیون میزبان ترشح می‌شوند (Dean *et al*., 2005؛ Kämper *et al*., 2006؛ Yoshida *et al*., 2009؛ Duplessis *et al*., 2011). اطلاعات محدودی در رابطه با عملکرد اغلب افکتورها موجود است و هر کدام از آنها از نظر توالی همولوژی پایینی با پروتئین‌هایی با عملکرد از پیش تعیین شده نشان می‌دهند. با این وجود، مجموعه افکتورهای یک بیمارگر عامل تعیین‌کننده اصلی در تعیین میزبان آن بیمارگر است و می‌توانند در موفقیت یا عدم توفیق بیمارگر در میدان مبارزه با میزبان مؤثر باشند (Raffaele *et al*., 2010؛ Sánchez-Vallet *et al*., 2018).

مطالعات مولکولی و ژنومیکی منجر به شناسایی بیش از ۶۰ افکتور قارچی متعلق به گونه‌های مختلف شده است. با این وجود، انتخاب عوامل افکتوری منتخب از هر گونه بیمارگر بسیار دشوار است (Sperschneider *et al*., 2015). به‌عنوان مثال، در مورد گونه *Blumeria graminis* f.sp. *horde* عامل سفیدک پودری گندم به تنهایی انتظار می‌رود که تقریباً ۷٪ از ژنوم آن پروتئین‌های افکتور ترشحی منتخب (CSEPs = Candidate Secreted Effector Proteins) را رمز نماید (Pedersen *et al*., 2012).

تحقیقات بنیادی انجام شده در رابطه با افکتورها، یک مرحله اساسی در رابطه با طراحی استراتژی‌های جدید کنترل بیمارگرهای گیاهی است. افکتورها نقش مهمی در اصلاح محصولات کشاورزی ایفا می‌کنند، به‌طوریکه در جهت ردیابی ژن‌های مقاومت در ارقام جدید، افکتورهای شناسایی شده می‌توانند در جهت تعیین لوکوس‌های حساسیت در محصولات آسیب‌پذیر استفاده شوند (Vleeshouwers and Oliver, 2014).

مشخصات ساختاری افکتورها

بیمارگرها، پروتئین‌های افکتوری را می‌سازند که در نهایت به داخل فضای آپوپلاستی (افکتورهای آپوپلاستی) و یا به داخل سلول‌های میزبان (افکتورهای سیتوپلاسمی) منتقل می‌شوند. افکتورها اغلب به‌وسیله شبکه آندوپلاسمی دستگاه گلژی که نیازمند یک پپتید انتهایی هیدروفوبیکی است، ترشح می‌شوند (Barlowe and Miller, 2013). تمامی افکتورهای شناسایی شده قارچی و شبه‌قارچی دارای یک پپتید نشانه (Signal Peptid) می‌باشند. ممکن است افکتورها پس از ترشح به داخل فضای آپوپلاستی به داخل سیتوپلاسم سلول‌های میزبان منتقل شوند. در اوومیست‌ها تاکنون دو گروه مشخص از افکتورهای سیتوپلاسمی شامل RXLRs و CRINKLERs توصیف شده‌اند. اغلب افکتورهای قارچی و شبه‌قارچی که از لحاظ عملکرد توصیف شده‌اند، دارای سیگنال پی در انتهای پروتئین بوده و از نظر اندازه کوچکتر از ۳۰۰ اسید آمینه و دارای چهار یا تعداد بیشتری اسیدآمینه سیستئین هستند (Mukhi *et al*., 2020).

شناسایی افکتورها

رویکردهای متنوعی منجر به شناسایی افکتورها یا ژن‌های آن‌ها از قارچ‌های بیمارگر گیاهی شده است. ساده‌ترین رویکرد شامل جداسازی پروتئین‌های افکتوری از مایعات خارج سلولی بافت‌های آلوده گیاهی می‌باشد. بعد از جداسازی، این پروتئین‌ها از طریق شکستن به روش ادمن و طیف‌سنج جرمی متوالی (Mass Spectophotometer) توالی‌یابی می‌شوند. با استفاده از این رویکرد، افکتورهای *Avr4*، *Avr4E*، *Avr9*، *Ecp5* (پروتئین‌های خارج سلولی از قارچ *C. fulvum*) و همچنین افکتور *Six1* (پروتئین ترشحی Secretory Protein در آوند چوبی) از بیمارگر قارچی *Fusarium oxysporum* و دو پپتید از قارچ *Uromyces vignae* شناسایی شده‌اند (Van der Does, 2008). در مواردی، فعالیت القاءکنندگی نکروزی در برگ‌ها در جهت خالص‌سازی یک پروتئین از عصاره‌های آپوپلاستی استفاده شد (Schottens-Toma and de Wit, 1988؛ D'Silva and Heath, 1997؛ Song *et al*., 2009). لازم به ذکر است که در یک رویکرد مرتبط، پروتئین‌های *Nip1*، *ToxA* و *ToxB* از محیط کشت‌های مصنوعی بر اساس فعالیت القاءکنندگی نکروزی و کلروزی شناسایی شده‌اند (Ballance *et al*., 1989؛ Tuori *et al*., 1995). یک رویکرد کاملاً متفاوت دیگر شامل غنی‌سازی توالی‌های DNA قارچی است که اختصاصاً در میزبان از طریق تکنیک‌های کاهشی cDNA بیان می‌شوند. ژن‌های *MIG1* و*MIG2* در بیمارگر قارچی *Ustilago maydis* از طریق این رویکرد با استفاده از مقایسه برگ‌های ذرت آلوده و غیرآلوده شناسایی شده‌اند (Basse *et al*., 2002؛ Basse *et al*., 2000). پروتئین CgDN3 از قارچ *Colletotrichum gloeosporioides* از طریق غربالگری کتابخانه cDNA ساخته شده از میسلیوم رشد کرده تحت فقر نیتروژن شناسایی شده است. آنالیزهای عملکردی نشان داد که این پروتئین منحصراً داخل گیاه بیان می‌شود و در تعامل مرتبط با گیاه میزبان نقش دارد (Stephenson *et al*., 2000). یک رویکرد متفاوت دیگر که در آن ژن‌های افکتوری شناسایی شده‌اند، شامل نقشه‌یابی ژنتیکی Genetic mapping بر اساس یک فنوتیپ غیربیماری‌زا است و به کمک این رویکرد ژن‌های *AvrL567* از قارچ *Melampsora lini* و *Avr-Pita*، *Avr1-CO39*، *PWL1* و *PWL2* از قارچ *Magnaporthe grisea* شناسایی شده‌اند. علاوه بر این، روش غربالگری نوین بر اساس القاء نکروز به دنبال

اگروواینفیلتراسیون (Agroinfiltration) است که در آن توالی‌های رمزگذاری کننده برای پروتئین‌های ترشحی در راستای بیان cDNA ژن‌های مورد نظر در برگ‌ها شناسایی می‌شوند مانند *Avr2* از قارچ *C. fulvum* (Luderer *et al*., 2002؛ Takken *et al*., 2000). اخیراً یک ابزار بیوانفورماتیکی به نام EffectorP معرفی شده است که برای اولین بار از سکرتوم (Secretome) به جای ویژگی‌های عمومی ذکر شده در جهت ارتقاء پیش‌بینی پروتئین‌های قارچی افکتوری از استفاده می‌نماید (Sperschneider *et al*., 2018). با توجه به اینکه این برنامه از خصوصیات مبتنی بر توالی در جهت پیش‌بینی افکتورهای قارچی از سکرتوم استفاده می‌نماید، وابستگی مستقیم به خصوصیات ذکر شده قبلی مربوط به انتخاب افکتورها مانند بیان افتراقی در شرایط گیاهی را محدود می‌نماید. در هر صورت، افکتورهای قارچی یک گروه بسیار ناهمگن از پروتئین‌ها هستند و اگرچه رویکردهای جدیدی مانند EffectorP، این امر را تسهیل کرده است، اما به‌صورت کلی شناسایی و انتخاب افکتورهای قارچی فرایند بسیار دشواری می‌باشد (Mirzadi Gohari *et al*., 2015). دسترسی به توالی ژنوم کامل بیمارگرهای خویشاوند یا استرین‌های مختلف از یک گونه بیمارگر، امکان مطالعات مقایسه‌ای در جهت شناسایی افکتورهای اصلی یا افکتورهای مختص دودمان را فراهم نموده است. مقایسه ژنوم بیمارگرهای قارچی گیاه ذرت شامل *Ustilago maydis* و *Sporisorium reilianum* منجر به شناسایی ۴۳ ناحیه ژنومی گردیده است که برخی از آن‌ها در یکی از گونه‌ها کاملاً وجود نداشت. قابل توجه آنکه این نواحی واگرا حاوی ژن‌هایی بودند که منحصراً در شرایط گیاهی بیان می‌شوند و پروتئین‌های ترشحی (افکتورها) را رمزگذاری می‌نمودند (Wollenberg and Schirawski, 2014). حذف ژن‌ها در این نواحی غنی از افکتور نقش آن‌ها را در بیماری‌زایی این بیمارگرها اثبات نمود؛ در نتیجه، این مطالعه توانایی ژنومیکس مقایسه‌ای را در انتخاب ژن‌ها به‌عنوان افکتورهای منتخب نشان داد (Schirawski *et al*., 2010). علاوه بر این، مقایسه ژنوم بیمارگرها نقش مهمی در جهت شناسایی افکتورهای اصلی و مختص دودمان بازی می‌نماید. به‌عنوان مثال، انجام مقایسه ژنومی بین چندین جدایه از بیمارگر آوندی *Verticillium dahliae*، منجر به شناسایی نواحی ژنومی بزرگی شده است. این نواحی به‌طور اختصاصی در داخل یک زیر مجموعه از جمعیت‌های بیمارگر وجود دارند. این نواحی غنی از ژن‌های منتخب افکتوری (ژن‌هایی که منحصراً در شرایط گیاهی بیان شده و منجر به تولید پروتئین‌های ترشحی می‌شوند) هستند و در کلنیزاسیون بافت‌های گیاه میزبان مشارکت دارند (De Jonge *et al*., 2013). ژن‌های افکتوری در بیمارگرهای گیاهی مانند *Leptosphaeria maculans* و*F. oxysporum* بر روی کروموزوم‌های خاصی تحت عنوان کروموزوم‌های غیرضروری (dispensable chromosomes) قرار دارند که در رشد بیمارگر نقشی نداشته، اما در بیماری‌زایی این بیمارگرها مشارکت دارند (Balesdent *et al*., 2013؛ Ma *et al*., 2010). مقایسه این گونه کروموزوم‌ها بین بیمارگرهای مرتبط، کشف و شناسایی افکتورها را تسهیل نموده است. به‌عنوان مثال، مقایسه کروموزوم‌های غیرضروری بین بیمارگر قارچی آلاینده حبوبات *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* با کروموزوم‌های *F. oxysporum* f.sp. *pisi* و *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* منجر به شناسایی نواحی ژنومی کوچک و حفاظت‌شده‌ای گردیده است که حاوی ژن‌هایی هستند که منحصراً در شرایط گیاهی بیان شده و پروتئین‌های ترشحی را تولید می‌نمایند (Balesdent *et al*., 2013). همانطور که قبلاً ذکر شد، مقایسات ژنومیکی می‌توانند در شناسایی افکتورهایی که توسط سیستم ایمنی ذاتی تشخیص داده می‌شوند، استفاده شوند. مقایسه استرین‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا می‌تواند منجر به شناسایی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism=SNPs) در نواحی کدکنندگی یک پروتئین منجر شده و یا به کشف چندشکلی‌های حضور و عدم حضور در نواحی ژنومیکی مختص یک استرین بیماری‌زا یا غیربیماری‌زا بیانجامد. به‌عنوان مثال، ژنومیک مقایسه‌ای چندین استرین بیماری‌زا و غیربیماری‌زا در بیمارگر *V. dahlia* منجر به شناسایی یک ناحیه به طول ۵۰kb گردید، که در این ناحیه یک ژن افکتوری به شدت بیان می‌شد. مطالعه دقیق‌تر نشان داد که این ناحیه در استرین‌های غیربیماری‌زا وجود داشته ولی استرین‌های بیماری‌زا فاقد آن هستند و متعاقباً اثبات گردید که این افکتور فاکتور بیماری‌زایی به نام *Ave1* است که از طریق گیاهان گوجه‌فرنگی حاوی پروتئین مقاومت *Ve1* شناسایی می‌گردد.

پاتوسیستم متشکل از بیمارگر قارچی *Cladosporium fulvum* و گیاه گوجه‌فرنگی

در راستای بررسی اساس ژنتیکی نقش افکتورها در تعاملات متقابل با گیاهان میزبان، از یافته‌های موجود در پاتوسیستم متشکل از بیمارگر قارچی *Cladosporium fulvum* و گیاه گوجه‌فرنگی در این قسمت استفاده شد. قارچ *C. fulvum* یک بیمارگر قارچی بیوتروفی غیراجباری می‌باشد که بیماری کپک برگی گوجه‌فرنگی را ایجاد می‌کند. منشأ این بیمارگر احتمالاً آمریکای مرکزی و جنوبی که منشأ اصلی گیاه گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) نیز است، می‌باشد. تاکنون، هیچ میزبان دیگری غیر از گیاه گوجه‌فرنگی برای این بیمارگر گزارش نشده است. اولین گزارش در مورد وقوع این بیماری بر روی گیاه گوجه‌فرنگی مربوط به سال ۱۸۸۳ در کارولینای شمالی آمریکاست (Cooke, 1883). قبل از دهه ۱۹۶۰ این بیمارگر خسارت اقتصادی جدی در تولید گیاه گوجه‌فرنگی در سرتاسر جهان ایجاد می‌کرد، ولی بعد از مدتی به دلیل وارد کردن چندین ژن مقاومت *Cf* به این بیماری از گونه‌های وحشی گیاه گوجه‌فرنگی به داخل ارقام تجاری، آلودگی ناشی از این بیمارگر تا حد زیادی کاهش یافت (Zhao *et al*., 2022). در هر صورت، اپیدمی‌های اخیر در تعدادی از کشورها که ارقام گوجه‌فرنگی فاقد ژن‌های مقاومت *Cf* در آن‌ها کشت‌وکار می‌شود و یا در مناطقی که کشت و کار ارقام گوجه‌فرنگی منجر به توسعه استرین‌های قارچی که قادر به شکستن مقاومت ناشی از ژن‌های مقاومت *Cf* هستند، گزارش شده است (de Wit, 1992, 2016). به دلیل عدم توالی‌یابی ژنوم گیاه گوجه‌فرنگی به‌طور کامل و شناسایی نژادهای متعددی از این بیمارگر که با ژن‌های مقاومت *Cf* در یک رقم خاص گیاه گوجه‌فرنگی در تعامل متقابل هستند، این پاتوسیستم به‌عنوان یک مدل در جهت مطالعه مولکولی تعاملات متقابل یک بیمارگر قارچی با یک گیاه مطرح شده‌است (Thomma *et al*., 2005).

تعاملات سازگار و ناسازگار در پاتوسیستم بیمارگر قارچی *Cladosporium fulvum* و گیاه گوجه‌فرنگی

در شرایط رطوبت نسبی بالا و دمای پایین، کنیدی‌های این بیمارگر در جهت توسعه هیف‌های رونده بر روی سطح پایین برگ‌های گیاه گوجه‌فرنگی جوانه می‌زند؛ به‌طوری‌که این هیف‌ها از طریق منافذ طبیعی (روزنه‌ها) وارد برگ‌های گیاه گوجه‌فرنگی می‌شوند. این هیف‌ها بعد از نفوذ ضخیم‌تر شده و فضای آپوپلاستی اطراف سلول‌های مزوفیل گیاه گوجه‌فرنگی را کلنیزه می‌کنند (Bart *et al*., 2005). در این بیمارگر ساختارهای تغذیه‌ای اختصاصی مانند اندام مکینه تولید نمی‌شود ولی بیمارگر می‌تواند در فضای آپوپلاستی حاوی قندها و اسیدهای آمینه (ساکارز و گلوتامین) زندگی کند (Joosten and de Wit, 1999). تقریباً ۱۰ الی ۱۴روز بعد از نفوذ بیمارگر، تعداد زیادی کنیدیوفور طویل در حال خروج از روزنه‌های سطح پایین برگ‌های آلوده، تولید می‌شوند. این رخدادها در واقع تعاملات سازگار در این پاتوسیستم محسوب می‌گردد که طی آن گیاه گوجه‌فرنگی آلوده می‌شود. با این حال، در تعاملات ناسازگار، در محل ورود هیف رونده به داخل فضای آپوپلاستی، سلول‌های مزوفیلی گیاه گوجه‌فرنگی حضور این بیمارگر را تشخیص داده و واکنش‌های دفاعی شامل واکنش فوق‌حساسیت مانع از رشد بیشتر بیمارگرهای بیوتروفی، روی می‌دهد (Stergiopoulos and de Wit, 2009).

در طی آلودگی، این بیمارگر پروتئین‌های ترشحی کوچک غنی از اسید آمینه سیستئین که کوچکتر از ۲۱ کیلودالتون هستند را به داخل فضای آپوپلاستی گیاه گوجه‌فرنگی ترشح می‌نماید؛ در صورت عدم حضور پروتئین، متناظر مقاومتی *Cf* به‌عنوان یک فاکتور بیماری‌زایی عمل نموده و در صورت حضور پروتئین متناظر که موجب تحریک لایه دوم دفاعی گیاه گوجه‌فرنگی می‌شود (Stergiopoulos and de Wit, 2009). این افکتورها امکان حمله و تجمع این بیمارگر را در بافت‌های گوجه‌فرنگی فراهم می‌نمایند. این پروتئین‌های افکتوری شامل *Avr2*، *Avr4*، *Avr4E* و *Avr9* هستند که تعاملات آنها توسط پروتئین‌های مقاومتی متناظر در گیاه به نام‌های *Cf-2*، *Cf-4*، *Cf-4E* و *Cf-9* تشخیص داده می‌شوند. علاوه بر این‌ها، چهار پروتئین خارج سلولی (Extracellular Protein) شامل *Ecp1*، *Ecp2*، *Ecp4* و*Ecp5* از این بیمارگر توصیف شده است، که تعاملات متقابل آن‌ها با پروتئین متناظر در لاین‌های گوجه‌فرنگی باعث ایجاد واکنش فوق‌حساسیت می‌شود (de Wit, 2016). لازم به ذکر است که اخیراً دو پروتئین از این دسته به نام‌های *Ecp6* و *Ecp7* نیز شناسایی شده‌اند، اما لاین‌های گوجه‌فرنگی حاوی پروتئین‌های مقاومتی

متناظر با آن‌ها شناسایی نشده است. تعدادی از این افکتورها، فاکتورهای بیماری‌زایی تهاجمی (Offensive) مانند افکتور *Avr2* و تعدادی نیز فاکتورهای بیماری‌زایی دفاعی (Defensive) مانند افکتورهای *Avr4* و *Ecp6* هستند (Stergiopoulos and de Wit, 2009؛ de Jonge and Thomma, 2009). همانطور که قبلاً ذکر گردید زمانی که یک فاکتور بیماری‌زایی از طریق سیستم ایمنی یک گیاه مقاوم تشخیص داده شود، این فاکتور به‌عنوان فاکتور غیربیماری‌زا شناخته می‌شود. در سطح مولکولی، تشخیص افکتورهای این بیمارگر به‌وسیله گیاه گوجه‌فرنگی از طریق پروتئین‌های مقاومت *Cf*، انجام می‌شود. این گیرنده‌ها در واقع گلیکوپروتئین‌های خارج سیتوپلاسمی هستند که در غشا یک سلول گیاه گوجه‌فرنگی قرار گرفته‌اند و متعلق به گروه‌های پروتئینی شبه‌گیرنده Receptor Like Proteins: RLPs هستند (Thomas *et al*., 1998). تحقیقات نشان داده است که حس و درک فاکتورهای غیربیماری‌زا از طریق پروتئین‌های مقاومت *Cf* متناظر در گیاه گوجه‌فرنگی باعث فعال شدن پاسخ‌های دفاعی مانند واکنش فوق‌حساسیت می‌گردد (Rivas and Thomas, 2005). تاکنون ده ژن تولیدکننده افکتور در این بیمارگر شامل ژن‌های *Avr2*، *Avr4*، *Avr4E* و *Avr9* و شش ژن کدکننده پروتئین‌های خارج سلولی *Ecp* شناسایی شده‌است. تصور بر این است که افکتورهای مختلف این بیمارگر عملکردهای ذاتی متفاوتی در ارتباط با بیماری‌زایی بر روی گیاه گوجه‌فرنگی دارا هستند. تاکنون نقش بیولوژیکی ذاتی تنها سه افکتور شامل *Avr2*، *Avr4* و *Ecp6* به‌خوبی توصیف شده است، علی‌رغم اثبات نقش سایر پروتئین‌های افکتوری به‌عنوان فاکتور بیماری‌زایی جدید در این پاتوسیستم؛ ولی همچنان نقش بیولوژیکی ذاتی آن‌ها نامشخص مانده است (Stergiopoulos and de Wit, 2009).

افکتور *Avr2*

از لحاظ اندازه، پروتئین بالغ *Avr2* از ۵۸ اسیدآمینه تشکیل شده است که شناسایی این افکتور توسط سیستم ایمنی لاین‌های گوجه‌فرنگی حاوی ژن مقاومت *Cf-2* باعث بروز واکنش فوق‌حساسیت در این گیاهان می‌شود. هشت اسید آمینه سیستئین موجود در ساختار این افکتور در تشکیل چهار پل دی‌سولفیدی درگیر بوده که نقش بسزایی در پایداری این مولکول در فضای آپوپلاستی گیاه گوجه‌فرنگی دارند (Luderer *et al*., 2002). طی فرایند بیماری‌زایی، پروتئین *Avr2* مانع از فعالیت چهار پروتئاز سیستئینی در گیاه گوجه‌فرنگی شامل *Rcr3*، *Pip1*، aleurain و *TDI65* می‌شود و به این ترتیب، با هدف قرار دادن و مهار پروتئازهای میزبان که در سیستم دفاعی میزبان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند، نقش تهاجمی در بیماری‌زایی بیمارگر ایفا می‌کند (Krüger *et al*., 2002). در حقیقت، نقش بیولوژیکی پروتئین *Avr2* نه تنها در بیماری‌زایی بیمارگر قارچی *C. fulvum* بلکه در سایر بیمارگرهای قارچی گیاه گوجه‌فرنگی شامل *Botrytis cinerea* و *Verticillium dahlia* نیز به اثبات رسیده‌است؛ به‌علاوه بیان هترولوگوسی (غیرمتجانس) این پروتئین در گیاه آرابیدوپسیس باعث افزایش حساسیت این گیاه در مقابل بیمارگرهای مذکور می‌گردد (van Esse *et al*., 2007). در حضور پروتئین مقاومتی Cf-2 ،افکتور *Avr2* به‌عنوان یک فاکتور غیربیماری‌زایی عمل می‌نماید و تشخیص آن به واسطه مولکول $Rcr3^{pimp}$ انجام می‌گیرد. $Rcr3^{pimp}$ یک پروتئاز سیستئینی است که منشأ آن گیاه گوجه‌فرنگی وحشی *Lycopersicon pimpinellifolium* است. علی‌رغم این حقیقت که سازوکار دقیق تشخیص پروتئین *Avr2* به‌خوبی مشخص نشده‌است، تغییر ساختار پروتئین Rcr3 از طریق افکتور*Avr2* به‌جای بازدارندگی *Rcr3*، محتمل‌ترین عامل فعال‌سازی واکنش‌های دفاعی به‌واسطه پروتئین مقاومتی Cf-2 است. یک واریانت طبیعی *Rcr3* در گیاه گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum*$Rcr3^{esc}$) وجود دارد که موجب واکنش خودبخودی در حضور پروتئین *Cf-2* بدون نیاز به حضور افکتور *Avr2* می‌شود. پروتئین $Rcr3^{esc}$ همچنان فعالیت پروتئازی از خود نشان داده و احتمالاً دارای یک ساختار تغییر یافته سه بعدی در مقایسه با پروتئین $Rcr3^{pimp}$ است (Ballance *et al*., 1989؛ Rooney *et al*., 2005). اجتناب از واکنش فوق‌حساسیت ایجاد شده به‌دلیل تعاملات متقابل بین پروتئین‌های *Avr2* و *Cf-2* می‌تواند از طریق جهش‌های نقطه‌ای، حذف و یا جاگذاری ترانسپوزون‌ها در ژن *Avr2* کسب گردد (Basse *et al*., 2002). تحقیق اخیر در مورد حضور چندشکلی در آلل‌های ژن *Avr2* در مجموعه جهانی از جدایه‌های بیمارگر قارچ *C. fulvum* بیانگر تعدد چندشکلی‌های غیرمترادف (Nonsynonymous Polymorphism) در مقایسه با چندشکلی‌های مترادف

(Synonymous Polymorphism) بود که بیانگر انتخاب تغییرپذیر مثبت است. اکثر حذف‌ها و جاگذاری‌های رخ داده در ناحیه کدکننده این ژن منجر به تولید پروتئین‌های Avr2 ناقص می‌شود (Stergiopoulos *et al*., 2007).

افکتور *Avr4*

ژن *Avr4* پروتئینی به‌طول ۸۶ اسید آمینه حاوی هشت اسید آمینه سیستین را رمزگذاری می‌کند (Basse *et al*., 2000). بر اساس الگوی اتصال دی‌سولفیدی *Avr4*، این پروتئین دارای شباهت ساختاری به پروتئین‌های دارای دومین متصل‌شونده به کیتین بی‌مهرگان، از قبیل تاکیسیتین Tachycitin (ine-ChBD) است (Bolton *et al*., 2008). در حقیقت، اتصال این پروتئین به مولکول کیتین به‌صورت آزمایشگاهی تأیید شده و نشان داده شده است که این پروتئین قادر است از قارچ‌های کیتین‌دار مانند *Trichoderma viride* و *Botrytis cinerea* در برابر کیتینازهای گیاهی محافظت نماید (Ciuffetti *et al*., 2010). درنتیجه، نقش محافظتی این پروتئین از بیمارگر *C. fulvum* در برابر کیتینازهای گیاهی طی فرایند آلودگی گیاه گوجه‌فرنگی پیشنهاد شده است. از آنجا که ژن *Avr4* منحصراً در طی مراحل آلودگی گیاه گوجه‌فرنگی، زمانی‌که این بیمارگر در معرض کیتیناز گیاهی قرار می‌گیرد، بیان می‌شود، دلیل محکمی دال بر نقش بیماری‌زایی این پروتئین فراهم می‌گردد (Cooke, 1883؛ van Esse *et al*., 2007). خاموشی ژن *Avr4* در بیمارگر *C. fulvum* به‌صورت معناداری بیماری‌زایی این بیمارگر را روی گیاه گوجه‌فرنگی کاهش می‌دهد. علاوه بر این، گیاهان گوجه‌فرنگی که پروتئین Avr4 در آن‌ها بیان شده است، بسیار حساس به بیمارگر *C. fulvum* و دیگر بیمارگرهای کیتین‌دار گیاه گوجه‌فرنگی (مانند *B. cinerea*) می‌باشند (Van den Burg *et al*., 2006). در حضور پروتئین مقاومتی Cf-4 افکتور *Avr4* واکنش فوق‌حساسیت یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها را تحریک می‌نماید، اما ایزوفرم‌هایی از این پروتئین در طبیعت یافت شده است که واکنش فوق‌حساسیت به‌دلیل برهمکنش پروتئین‌های *Cf-4* و *Avr4* را ایجاد نمی‌کنند. این قبیل ایزوفرم‌ها، جایگزینی‌های غیرمترادف بیش از حدی در مقایسه با جایگزینی‌های مترادف نشان می‌دهند که این امر پیشنهاد می‌نماید که این پروتئین تحت انتخاب تنوع‌پذیر مثبت بوده است؛ در حالی‌که، اکثریت تنوع‌های طبیعی مشاهده شده در پروتئین *Avr4* شامل جهش‌های نقطه‌ای است که اغلب موجب جایگزینی اسید آمینه‌های سیستئینی می‌شود (de Jonge *et al*., 2013). واریانت‌های ناپایدار حاصله این افکتور اغلب به پروتئازهای گیاهی بسیار حساس بوده، اما خاصیت متصل‌شوندگی آن‌ها به مولکول کیتین حفظ شده است. درنتیجه، این امر از یک سو موجب حفظ خاصیت بیماری‌زایی پروتئین‌ها شده اما از سوی دیگر، مانع از تجمع *Avr4* در فضای آپوپلاستی و تحریک واکنش فوق‌حساسیت در گیاهان حاوی پروتئین مقاومتی Cf-4 نیز می‌شود (Joosten *et al*., 1997). همولوگ افکتور *Avr4* در سایر بیمارگرهای قارچی متعلق به رده قارچ‌های ناقص (Dothideomycete) از جمله *Mycosphaerella fijiensis*، عامل ایجادکننده بیماری سیاه سیگاتوکای موز شناسایی شده است. اثبات شده است که *Avr4* موجود در قارچ *M. fijiensis* یک ارتولوگ عملکردی از افکتور *C. fulvum Avr4* است که از دیواره سلولی قارچی در برابر هیدرولیز توسط کیتینازهای گیاهی از طریق اتصال به کیتین محافظت می‌کند و علی‌رغم شباهت کم با توالی *C. fulvum Avr4*، این ارتولوگ قادر به ایجاد واکنش فوق‌حساسیت بر روی لاین‌های گوجه‌فرنگی حاوی *Cf-4* است (de Jonge *et al*., 2009).

افکتور *Ecp6*

این افکتور یک پروتئین به طول ۲۲۸ اسیدآمینه حاوی سه دومین *LysM* متصل‌شونده به کربوهیدرات را رمزگذاری می‌نماید (de Jonge *et al*., 2009). نقش ذاتی این افکتور اخیراً توصیف شده و نتایج حاصله که در مجله معتبر Science به چاپ رسیده، بیانگر این موضوع است که این افکتور قادر به اتصال به قطعات کوچک کیتینی که از دیواره سلولی قارچ در طی فرایند آلوده‌سازی آزاد می‌شوند، است. این قطعات آزاد شده کیتینی می‌توانند از طریق گیرنده‌های موجود در سطح غشاء سلول‌های گیاه گوجه‌فرنگی شناسایی شده و منجر به فعال شدن اولین لایه دفاعی گیاه (PTI) شوند (de Jonge *et al*., 2010). پرهیز از تشخیص مولکول‌های کیتین بسیار اهمیت دارد، به این دلیل که خاموشی ژن *Ecp6*، موجب کاهش بیماری‌زایی بیمارگر *C. fulvum* روی گیاه گوجه‌فرنگی می‌گردد (Bolton *et al*., 2008). در واقع، این

افکتور توسط این بیمارگر به فضای آپوپلاستی ترشح شده و مانع از تشخیص مولکول‌های کیتین توسط سیستم ایمنی ذاتی گیاه (یا به عبارتی مانع از فعال شدن PTI) می‌گردد. همولوگ‌های متعددی مانند *Mg1LysM* و *Slp1* از این افکتور در گونه‌های مختلف قارچی شناسایی شده‌اند؛ پیشنهاد شده‌است که این افکتور نقش مهمی در جلوگیری از ایمنی تحریک شده به‌وسیله مولکول کیتین در بسیاری از تعاملات متقابل بین بیمارگرهای قارچی و گیاهان میزبان بازی دارد (de Jonge *et al*., 2009). نقش بیولوژیکی این افکتور در دو بیمارگر قارچی شامل *Zymoseptoria tritici* و *Magnaporthe oryza* توصیف شده است. قارچ *Z. tritici* (عامل بیماری سپتوریوز گندم) سه افکتور حاوی دومین *LysM* به نام‌های (*Mg1LysM*، *Mg3LysM* و *MgxLysM*) که همولوگ *Ecp6* هستند، ترشح می‌نماید. مشابه با افکتور *Ecp6* در بیمارگر *C. fulvum*، هر دو افکتور *Mg1LysM* و *Mg3LysM* قادر به اتصال به مولکول‌های کیتین هستند، ولی برخلاف افکتور *Ecp6* هر دو افکتور باعث محافظت از بیمارگر قارچی *Z. tritici* در برابر کیتینازهای گیاهی می‌شوند. علاوه بر این، مشخص شده است که منحصراً *Mg3LysM* مانع از ایمنی تحریک شده به‌وسیله مولکول کیتین می‌گردد. در هر صورت، منحصراً موتانت‌هایی که در آن‌ها ژن *Mg3LysM* حذف گردیده است، به‌صورت معنی‌داری قدرت بیماری‌زایی خود را روی گیاه گندم از دست می‌دهند (Marshall *et al*., 2011). مشابه با افکتورهای *Ecp6* و *Mg3LysM*، بیمارگر قارچی *Magnaporthe oryza* (عامل بیماری بلاست برنج) افکتوری تحت عنوان *Slp1* دارد که به قطعات کوچک کیتین متصل شده و مانع از شناسایی آن‌ها توسط گیرنده‌های تشخیصی کیتینی می‌گردد (Marshall *et al*., 2011). گیرنده CEBiP = Chitin Elicitor Binding Protein که قادر به تشخیص مولکول‌های کیتین و فعال نمودن PTI است، در گیاه برنج به خوبی توصیف شده است. علاوه بر این، اثبات شده‌است که افکتور *Slp1* مانع از فعال شدن ایمنی مبتنی بر مولکول کیتین از طریق رقابت با گیرنده CEBiP برای اتصال به مولکول کیتین می‌شود (Mentlak *et al*., 2012). این امر محتمل است که افکتور *Ecp6* همچنین قادر به رقابت با گیرنده‌های الگویی تشخیصی گیاه گوجه‌فرنگی که مولکول کیتین را تشخیص می‌دهد، باشد (de Jonge *et al*., 2009).

منابع References

Balesdent, M.H., Fudal, I., Ollivier, B., Bally, P., Grandaubert, J., Eber, F., Chèvre, A.M., Leflon, M. and Rouxel, T. 2013. The dispensable chromosome of L eptosphaeria maculans shelters an effector gene conferring avirulence towards *Brassica rapa*. New Phytologist 198(3): 887-898.

Ballance, G., Lamari, L. and Bernier, C. 1989. Purification and characterization of a host-selective necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. Physiological and Molecular Plant Pathology 35(3): 203-213.

Barlowe, C and Miller, E. 2013. Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. Genetics 193(2): 383-410.

Bart, P.H.J., Thomma, H., van Esse, P., Crous, P. and de Wit, P. 2005. *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. Molecular Plant Pathology 6(4): 379-393.

Basse, C.W., Kolb, S. and Kahmann, R. 2002. A maize-specifically expressed gene cluster in *Ustilago maydis*. Molecular Microbiology 43(1): 75-93.

Basse, C.W., Stumpferl, S. and Kahmann, R. 2000. Characterization of a *Ustilago maydis* gene specifically induced during the biotrophic phase: evidence for negative as well as positive regulation. Molecular and Cellular Biology 20(1): 329-339.

Bolton, M.D., Van Esse, H.P., Vossen, J.H., De Jonge, R., Stergiopoulos, I., Stulemeijer, I.J., Van Den Berg, G.C., Borrás-Hidalgo, O., Dekker, H.L., De Koster, C.G. and De Wit, P.J. 2008. The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. Molecular microbiology 69(1): 119-136.

Ciuffetti, L.M., Manning, V.A., Pandelova, I., Betts, M.F. and Martinez, J.P. 2010. Host-selective toxins, Ptr ToxA and Ptr ToxB, as necrotrophic effectors in the *Pyrenophora tritici-repentis*–wheat interaction. New Phytologist 187(4): 911-919.

Cooke, M. 1883. New american fungi. Grevillea 12: 22-33.

de Jonge, R., Bolton, M.D., Kombrink, A., van den Berg, G.C., Yadeta, K.A. and Thomma, B.P. 2013. Extensive chromosomal reshuffling drives evolution of virulence in an asexual pathogen. Genome Research 23(8): 1271-1282.

de Jonge, R. and Thomma, B.P. 2009. Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? Trends in Microbiology 17(4): 151-157.

De Jonge, R., Peter van Esse, H., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., Van Der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M.H. and Thomma, B.P. 2010. Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. Science 329(5994): 953-955.

de Wit, P.J. 1992. Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 30(1): 391-418.

de Wit, P.J.G.M. 2016. *Cladosporium fulvum* Effectors: Weapons in the Arms Race with Tomato. Annual Review of Phytopathology 54(1):1-23.

de Wit, P.J.G.M., Mehrabi, R., Van Den Burg, H. and Stergiopoulos, I. 2009. Fungal effector proteins: past, present and future. Molecular Plant Pathology 10(6): 735–747.

Dean, R.A., Talbot, N.J., Ebbole, D.J., Farman, M.L., Mitchell, T.K., Orbach, M.J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J.R., Pan, H. and Read, N.D. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Nature 434: 980–986.

Dodds, P. 2023. From Gene-for-Gene to Resistosomes: Flor's Enduring Legacy. MPMI 36(8): 461–467.

D'Silva, I. and Heath, M.C. 1997. Purification and characterization of two novel hypersensitive response-inducing specific elicitors produced by the cowpea rust fungus. Journal of Biological Chemistry 272(7): 3924-3927.

Duplessis, S., Cuomo, C.A., Lin, Y.C., Aerts, A., Tisserant, E., Veneault-Fourrey, C., Joly, D.L., Hacquard, S., Amselem, J., Cantarel, B.L. et al. 2011. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. PNAS 108(22): 9166-9171.

Friesen, T.L., Meinhardt, S.W. and Faris, J.D. 2007. The *Stagonospora nodorum*-wheat pathosystem involves multiple proteinaceous host-selective toxins and corresponding host sensitivity genes that interact in an inverse gene-for-gene manner. The Plant Journal 51(4): 681-692.

Ghiasi Noei, F., Imami, M., Didaran, F., Ghanbari, M.A., Zamani, E., Ebrahimi, A., Aliniaeifard, S., Farzaneh, M., Javan-Nikkhah, M., Feechan, A. and Mirzadi Gohari, A. 2022. Stb6 mediates stomatal immunity, photosynthetic functionality, and the antioxidant system during the *Zymoseptoria tritici*-wheat interaction. Frontier in Plant Science 13: 1004691.

Hetmann, A. and Kowalczyk, S. 2019. Suppression of PAMP-triggered immunity (PTI) by effector proteins synthesized by phytopathogens and delivered into cells of infected plant. Postepy Biochemii 22: 65(1): 58-71.

Joosten, M.H. and de Wit, P.J. 1999. The tomato– *Cladosporium fulvum* interaction: A versatile experimental system to study plant-pathogen interactions. Annual Review of Phytopatholog 37(1): 335-367.

Joosten, M., Vogelsang, R., Cozijnsen, T.J., Verberne, M.C. and de Wit, P.J. 1997. The biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* circumvents Cf-4-mediated resistance by producing unstable AVR4 elicitors. The Plant Cell 9(3): 367-379.

Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Müller, O. and Perlin, M.H. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. Nature 444: 97–101.

Kema, G.H.J., Mirzadi Gohari, A., Aouini, L., Hay, G., Ware, S.B., Van Den Bosch, F., Manning-Smith, R., Alonso-Chavez, V., Helps, J., Ben M'Barek, S., Mehrabi, R., Diaz-Trujillo, C., Zamani, E., et al. 2018. Stress and sexual reproduction affect the dynamics of the wheat pathogen effector AvrStb6 and strobilurin resistance. Nature Genetics 50: 375-380.

Kruger, J., Thomas, C.M., Golstein, C., Dixon, M.S., Smoker, M., Tang, S., Mulder, L. and Jones, J.D. 2002. A tomato cysteine protease required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. Science 296(5568): 744-747.

Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., Zuccaro, A., Reissmann, S. and Kahmann, R. 2015. Fungal effectors and plant susceptibility. Annual Review of Plant Biology 66: 513-545.

Luderer, R., Takken, F.L., de Wit, P.J.d. and Joosten, M.H. 2002. *Cladosporium fulvum* overcomes Cf-2-mediated resistance by producing truncated AVR2 elicitor proteins. Molecular Microbiology 45(3): 875-884.

Ma, L.J., Van Der Does, H.C., Borkovich, K.A., Coleman, J.J., Daboussi, M.J., Di Pietro, A., Dufresne, M., Freitag, M., Grabherr, M., Henrissat, B. and Houterman, P.M. 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in Fusarium. Nature 464(7287): 367-373.

Mapuranga, J., Zhang, L., Zhang, N. and Yang Wenxiang, Y. 2022. The haustorium: The root of biotrophic fungal pathogens. Plant Pathogen Interactions 13(29): 963705.

Marshall, R., Kombrink, A., Motteram, J., Loza-Reyes, E., Lucas, J., Hammond-Kosack, K.E., Thomma, B.P. and Rudd, J.J. 2011. Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus *Mycosphaerella graminicola* reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat. Plant Physiology 156(2): 756-769.

Mendgen, K. and Hahn, M. 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. Trends in plant science 7(8): 352-356.

Mentlak, T.A., Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L.S., Otomo, I., Saitoh, H., Terauchi, R., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B.P. and Talbot, N.J. 2012. Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. The Plant Cell 24(1): 322-335.

Gohari, A.M., Ware, S.B., Wittenberg, A.H., Mehrabi, R., M'Barek, S.B., Verstappen, E.C., Van der Lee, T.A., Robert, O., Schouten, H.J., De Wit, P.P. and Kema, G.H. 2015. Effector discovery in the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. Molecular Plant Pathology 16(9): 931-945.

Mukhi, N., Gorenkin, D. and Banfield, M.J. 2020. Exploring folds, evolution and host interactions: understanding effector structure/function in disease and immunity. New Phytologist 227 (2): 326–333.

Pedersen, C., ver Loren van Themaat, E., McGuffin, L.J., Abbott, J.C., Burgis, T.A., Barton, G., Bindschedler, L.V., Lu, X., Maekawa, T., Wessling, R., Cramer, R., Thordal-Christensen, H., Panstruga, R. and Spanu, P.D. 2012. Structure and evolution of barley powdery mildew effector candidates. BMC Genomics 13: 694.

Oerke, E.C. 2006. Crop losses to pests. The Journal of Agricultural Science 144(1): 31-43.

Rivas, S. and Thomas, C.M. 2005. Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. Annual Review of Phytopathology 43: 395-436.

Rooney, C.E., Van`t Klooster, J.W., van der Hoom, R.A., Joosten, M.H., Jones, J.D., de Wit, P.J. 2005. Cladosporium Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance Science 308(5729): 1783-1786.

Raffaele, S., Farrer, R.A., Cano, L.M., Studholme, D.J., MacLean, D., Thines, M., Jiang, R.H., Zody, M.C., Kunjeti, S.G., Donofrio, N.M., Meyers, B.C., Nusbaum, C. and Kamoun, S. 2010. Genome evolution following host jumps in the Irish potato famine pathogen lineage.SCIENCE 330(6010): 1540-1543.

Sánchez-Vallet, A., Fouché, S., Fudal, I., Hartmann, F.E., Soyer, J.L., Tellier, A. and Croll, D. 2018. The genome biology of effector gene evolution in filamentous plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 56: 21-40.

Schottens-Toma I.M. and de Wit, P.J. 1988. Purification and primary structure of a necrosis-inducing peptide from the apoplastic fluids of tomato infected with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). Physiological and Molecular Plant Pathology 33(1): 59-67.

Schirawski, J., Mannhaupt, G., Münch, K., Brefort, T., Schipper, K., Doehlemann, G. Di Stasio, M., Rössel, N., Mendoza-Mendoza, A., Pester, D. and Müller, O. 2010. Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. Science 330(6010): 1546-1548.

Song, J., Win, J., Tian, M., Schornack, S., Kaschani, F., Ilyas, M., van der Hoorn, R.A. and Kamoun, S. 2009. Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. PANS 106(5): 1654-1659.

Sperschneider, J., Dodds, P.N., Gardiner, D.M., Singh, K.B. and Taylor, J.M. 2018. Improved prediction of fungal effector proteins from secretomes with EffectorP 2.0. Molecular Plant Pathology 19(9): 2094-2110.

Strange, R.N. and Scott, P.R. 2005. Plant disease: a threat to global food security. Annual Review of Phytopathology. 43: 83-116.

Stephenson, S.A., Hatfield, J., Rusu, A.G., Maclean, D.J. and Manners, J.M. 2000. CgDN3: an essential pathogenicity gene of *Colletotrichum gloeosporioides* necessary to avert a hypersensitive-like response in the host *Stylosanthes guianensis.* Molecular Plant-Microbe Interactions 13(9): 929-941.

Stergiopoulos, I., de Kock, M.J., Lindhout, P. and de Wit, P.J. 2007. Allelic variation in the effector genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* reveals different modes of adaptive evolution. Molecular Plant-Microbe Interactions 20(10): 1271-1283.

Stergiopoulos, I. and de Wit, P.J. 2009. Fungal effector proteins. Annual Review of Phytopathology 47: 233-263.

Takken, F.L., Luderer, R., Gabriëls, S.H., Westerink, N., Lu, R., De Wit, P.J. and Joosten, M.H. 2000. A functional cloning strategy, based on a binary PVX-expression vector, to isolate HR-inducing cDNAs of plant pathogens. The Plant Journal 24(2): 275-283.

Thomas, C.M., Dixon, M.S., Parniske, M., Golstein, C. and Jones, J.D. 1998. Genetic and molecular analysis of tomato Cf genes for resistance to *Cladosporium fulvum*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences 353(1374): 1413-1424.

Thomma, B.P., van Esse, H.P., Crous, P.W. and de Wit, P.J. 2005. *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. Molecular Plant Pathology 6(4): 379-393.

Tuori, R., Wolpert, T. and Ciuffetti, L. 1995. Purification and immunological characterization of toxic components from cultures of *Pyrenophora tritici-repentis*. Molecular Plant-Microbe Interactions 9(43): 10.3.

Van Kan, J.A. 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. Trends in plant science 11(5): 247-253.

Van den Burg, H.A., Harrison, S.J., Joosten, M.H., Vervoort, J. and de Wit, C**P.J. 2006.** *ladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. Molecular Plant-Microbe Interactions 19(12): 1420-1430.

Van der Does, H.C., Duyvesteijn, R., Goltstein, P., Schie, C., Manders, E., Cornelissen, B and Rep, M. 2008. Expression of effector gene SIX1 of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells. Fungal Genetics Biology 45(9): 1257-1264.

van Esse, H.P., Bolton, M.D., Stergiopoulos, I., de Wit, P.J. and Thomma, B.P. 2007. The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor. Molecular Plant-Microbe Interactions 20(9): 1092-1101.

Vleeshouwers, V.G. and Oliver, R.P. 2014. Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. Molecular pLant-Microbe Interactions 27(3): 196-206.

Wollenberg, T. and Schirawski, J. 2014. Comparative genomics of plant fungal pathogens: The *Ustilago sporisorium* paradigm. PLoS Pathogy 10(7): e1004218.

Yoshida, M., Takayanagi, Y., Inoue, K., Kimura, T., Young, L.J., Onaka, T. and Nishimori, K. 2009. Evidence that oxytocin exerts anxiolytic effects via oxytocin receptor expressed in serotonergic neurons in mice. Journal of Neuroscience 29(7): 2259-2271.

Yu, I., Parker. J. and Bent A.F. 1998. Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in Arabidopsis dnd1 mutant. PNAS 95(13): 7819-7824.

Zhao, T., Pei, T., Jiang, J., Yang, H., Zhang, H., Li, J. and Xu, X. 2022. Understanding the mechanisms of resistance to tomato leaf mold: A review. Horticultural Plant Journal 8(6): 667-675.

Molecular basis of interactions between fungal effectors and host plants

A. Mirzadi Gohari[1] and F. Lak[2*]

Received: 5 Oct., 2023 Accepted: 29 Nov., 2023

ABSTRACT

Molecular interactions between fungal pathogens and host plants is a very complex and dynamic process that manifests itself in two different ways such as adaptive and incompatible responses. In the adaptive state, plants become diseased as a result of pathogen attack. On the other hand, through the incompatibility state, plants show resistance after pathogen attack. One of the key aspects in these interactions is the secretion of small protein molecules by fungal pathogens. These small molecules, commonly known as effectors, are acquired during evolution by fungal pathogens. These effectors play a very vital role in changing the physiology of host plants and suppressing their defense responses. This review article examines the genetic basis of these molecular interactions between the effectors of fungal pathogens and host plants, emphasizing the patho-system consisting of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum* and the tomato plant. This study can help to better understanding how the disease occurs or the resistance of host plants against fungal pathogens and provides a basis for the development of new approaches to control plant diseases.

Key words: Biological function, Effector, Interaction, Plant Pathogen

1 and 2. Assistant Professor and PhD student, respectively, Department of Plant Pathology, Faculty of Agricultural Sciences and Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
Corresponding author: farzaneh.lak@ut.ac.ir