

# Structural diversity and biosynthetic gene clusters of non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) in the genome of *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of common bean anthracnose

1. Motahare Fatehi<sup>1</sup>: Department of Plant Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
2. Leila Shabani<sup>2\*</sup>: Department of Plant Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
3. Somayeh Reisi<sup>3</sup>: Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
4. Mohammad Sayari<sup>4</sup>: Department of Plant Science, Agriculture Building, University of Manitoba, Winnipeg, Canada

\*Corresponding Author's Email Address: lshabani@gmail.com

## Article Type:

Original Research

Received: 22 December 2025

Revised: 08 February 2026

Accepted: 11 February 2026

**How to Cite:** Fatehi, M., Shabani, L., Reisi, S., & Sayari, M. (2024). Structural diversity and biosynthetic gene clusters of non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) in the genome of *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of common bean anthracnose. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 60(4), 401-420.

DOI: 10.22034/IJPP.2026.2021891.510



© 2024 the authors. Published by Maher Publishing Institute. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) License.

## Abstract:

Secondary metabolites of fungi, particularly non-ribosomal peptides (NRPs), are key virulence and ecological adaptation factors. These compounds are primarily synthesized by giant non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs), which can incorporate a wide range of amino acids, including non-proteinogenic and D-amino acids, to produce molecules with potent biological activities. In this study, the genome of a phytopathogenic fungus, *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of common bean (*Phaseolus vulgaris*) anthracnose, was analyzed for the first time for NRPS biosynthetic gene clusters. Using a combination of genomic analyses, 14 NRPS genes were identified, comprising 6 single-module and 8 multi-module genes. Domain analysis revealed that four multi-module NRPSs unusually terminate with a PP domain instead of the typical condensation domain, while one terminates with an epimerization domain, suggesting alternative peptide release mechanisms. Phylogenetic analysis of adenylation domains formed 14 distinct clades, several of which (NRPS1, NRPS4 and NRPS8) displayed high homology with known NRPSs involved in apicidin and siderophore production. These findings highlight the considerable diversity of secondary metabolite pathways in *C. lindemuthianum*, which likely contributes to host specificity, iron acquisition, and pathogenicity. The results provide a critical foundation for future functional studies (gene knockouts, metabolomics, and virulence assays) to elucidate the precise roles of these clusters in the pathogen–host interaction and to develop novel biological control strategies for bean anthracnose.

**Keywords:** Apicidin, *Colletotrichum lindemuthianum*, Non-ribosomal peptides, Pathogenicity, Siderophore.

## Extended Abstract

### Introduction

Fungi produce secondary metabolites (SMs) via dedicated pathways distinct from primary metabolism. These compounds are vital for ecological roles such as competition, stress resistance, symbiosis, and pathogenesis (Bills & Gloer, 2016; Keller, 2019). In phytopathogenic filamentous fungi, SMs facilitate early infection stages by enabling host penetration, colonization, and suppression of plant defenses (Jaswal et al., 2020). They can inhibit innate immunity, degrade cell walls, or alter host signaling (Bills & Gloer, 2016).

Fungal SMs include shikimate derivatives, polyketides, terpenoids, and non-ribosomal peptides (NRPs). Their biosynthetic genes are typically clustered in biosynthetic gene clusters (BGCs) (Bills & Gloer, 2016). Non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) are modular mega-enzymes that assemble peptides from diverse amino acids (including D- and non-proteinogenic forms) without ribosomes (Walsh et al., 2013). NRPS-derived NRPs frequently act as virulence factors, such as phytotoxins or siderophores. Examples include iron-acquisition siderophores in *Fusarium graminearum* that promote wheat infection (Greenshields et al., 2007), and alternariol precursors in *Alternaria alternata* that suppress salicylic acid defenses (Chen et al., 2013).

*Colletotrichum lindemuthianum* causes anthracnose in common bean (*Phaseolus vulgaris*), leading to major yield losses. Conventional management (certified seed, fungicides, rotation, resistant cultivars) is limited by pathogen variability and resistance issues (Milgroom & Fry, 1997; Pastor-Corrales, 2004). Over 84 *Colletotrichum* genomes are sequenced (NCBI GenBank, 2024–2025), yet many SM genes remain poorly characterized. These genomes are enriched in pathogenicity genes, including PCWDEs, proteases, and SM biosynthetic machinery (Rao & Nandineni, 2017). Recent large-scale analyses identified hundreds of thousands of BGCs, with >99%

uncharacterized, highlighting untapped diversity in *Colletotrichum* (Zhang et al., 2024; Wei et al., 2025).

Tools like antiSMASH enable rapid NRPS and BGC detection in fungal pathogens (Blin et al., 2023; Sayari et al., 2025). This study is the first comprehensive NRPS analysis in *C. lindemuthianum*. To identify NRPS genes and BGCs in the *C. lindemuthianum* genome, characterize domain organization, phylogenetically classify adenylation (A) domains, and predict potential products (e.g., siderophores, apicidin-like toxins) through synteny comparisons. The aim is to uncover SM pathways potentially involved in virulence, iron uptake, and bean host adaptation.

### Methods and Materials

The genome assembly (GCA\_001693025) was mined using antiSMASH v7.1.0 (relaxed detection strictness) for BGC prediction (Blin et al., 2023). NRPS loci were validated in CLC Genomics Workbench v21.0.1 and confirmed via BLASTp/tBLASTn (>60% identity, conserved domains) against known fungal NRPS. Genes were annotated with AUGUSTUS (*Verticillium* model). Domains (A, T/PP, C, E, Te, etc.) were analyzed using NRPS/PKS portal and NCBI CDD (Bachmann & Ravel, 2009; Marchler-Bauer et al., 2010). Functional NRPS required at least one A-T-C module (Rausch et al., 2007).

A-domain phylogeny employed Neighbor-Joining in MEGA7 (appropriate models, 1000 bootstraps) (Kumar et al., 2016). Clades were defined by  $\geq 70\%$  bootstrap, domain conservation, and synteny. Clusters were compared to characterized BGCs from *F. poae* (apicidin), *C. gloeosporioides* (ferrichrome), and *C. orbiculare* (apicidin-like).

### Findings

From 33 candidate BGCs, 14 NRPS genes clusters were confirmed (8 multi-modular, 6 mono-modular). Common domain patterns: A-C-PP, A-PP-E, and A-PP-Te. Multi-modular examples include PP-C-A-PP-C-C-A-PP (NRPS3), A-C-A-PP-C-PP-C-A-C-PP-C-PP (NRPS8), and A-PP-C-C-A-PP-C-A-PP-C-A-PP (NRPS1).

Phylogeny of A domains yielded 14 clades (A–N). Key inferences:

- Clade H (NRPS1): apicidin-like synthase (orthologous to *F. poae*)
- Clade F (NRPS4): apicidin/HC-toxin-like (related to *C. orbiculare*)
- Clade G (NRPS8): hydroxamate ferrichrome siderophore synthase (close to *C. gloeosporioides*, *Fusarium*, *Verticillium*)

Synteny analysis:

- NRPS1 cluster (16 genes): shared core genes (P450, FAD-oxidase, aminotransferase, FAS, oxidoreductase, transporter, TF) with *F. poae* apicidin BGC, but missing N-methyltransferase.
- NRPS4 cluster (21 genes): partial synteny with *C. orbiculare* apicidin-like BGC, lacking key modifiers.
- NRPS8 cluster (16 genes): highly conserved with *C. gloeosporioides* ferrichrome pathway, retaining SidA-like monooxygenase, transporter, regulator.

Notably, several multi-modular NRPS terminated with PP domain instead of typical C or Te.

## Discussion and Conclusion

This study first maps the NRPS repertoire in *C. lindemuthianum*, identifying 14 genes with varied architectures. Terminal PP domains suggest alternative peptide-release mechanisms, possibly taxon-specific (Sayari et al., 2019; Gibson et al., 2014).

NRPS8 is predicted to synthesize ferrichrome siderophores, essential for iron chelation and virulence phase modulation (Caza & Kronstad, 2013; Haas et al., 2008; Albarouki et al., 2014). Its stronger similarity to *Fusarium* orthologs hints at convergent evolution or gene transfer.

NRPS1 and NRPS4 resemble apicidin pathways (cyclic HDAC-inhibiting tetrapeptides linked to host-specific virulence) (Darkin-Rattray et al., 1996; Witte et al., 2021), yet lack tailoring genes, suggesting adapted or partial pathways suited to bean infection. Rearrangements and

losses in such clusters are frequent in *Colletotrichum* (Sayari et al., 2025).

This NRPS diversity likely enhances colonization, competition, iron homeostasis, and infection-phase regulation. Many BGCs require plant elicitors for expression (Brakhage & Schroeckh, 2021), calling for integrated omics under infection conditions.

Future work (gene knockouts, metabolomics, virulence assays) is critical to validate products and functions. Results may inform targeted anthracnose management, e.g., NRPS inhibitors, siderophore blockers, or HIGS approaches.

## Conflict of Interest

There is no conflict of interest in conducting the present study.

## Ethical Considerations

All ethical principles and standards were fully observed in the conduct of this research.

## Acknowledgments

The authors are grateful for the grant from Shahrekord University, Iran grant number: 0GRN34M1032.

# ساختار و تنوع ژن‌های پتیدسنتاز غیرریبوزومی (NRPS) در ژنوم *Colletotrichum lindemuthianum*، عامل آنتراکنوز لوبیا

۱. مطهره فاتحی<sup>ID</sup>: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
  ۲. لیلا شبانی<sup>ID</sup>: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
  ۳. سمیه رئیسی<sup>ID</sup>: گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
  ۳. محمد سیاری<sup>ID</sup>: گروه علوم گیاهی، ساختمان کشاورزی، دانشگاه مانتوبا، کانادا
- \*پست الکترونیک نویسنده مسئول: lshabani@gmail.com

## نوع مقاله:

## چکیده

پژوهشی اصیل

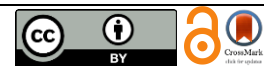
متابولیت‌های ثانویه قارچ‌ها، به‌ویژه پتیدهای غیرریبوزومی، از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی و سازگاری بوم‌شناختی این موجودات به شمار می‌روند. این ترکیبات را عمدتاً آنزیم‌های پتیدسنتاز غیرریبوزومی سنتز می‌کنند که قادر به استفاده از طیف گسترده‌ای از آمینواسیدها و تولید مولکول‌هایی با فعالیت‌های زیستی قوی هستند. در این پژوهش برای اولین بار ژنوم قارچ بیماری‌زای *Colletotrichum lindemuthianum*، عامل آنتراکنوز لوبیا (*Phaseolus vulgaris*)، از نظر خوشه‌های ژنی پتیدسنتازهای غیرریبوزومی مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از ترکیبی از واکاوای ژنومیکی، ۱۴ ژن پتیدسنتاز غیرریبوزومی شناسایی شد که شامل ۶ ژن تک‌پودمانی و ۸ ژن چندپودمانی بود. واکاوای ساختار دامانه‌ای نشان داد که ۴ ژن چندپودمانی به‌جای دامانه تراکمی معمول، با دامانه پروتئین حامل پتیدیل (PP) و در یک مورد با دامانه اپیمیزاسیون خاتمه می‌یابند؛ ساختاری که سازوکارهای غیرمعمول آزادسازی پتید را پیشنهاد می‌کند. واکاوای فیلوژنتیکی دامانه‌های آدنیلایسیون، ۱۴ تبار مجزا ایجاد کرد که برخی از آن‌ها (NRPS<sub>۱</sub>، NRPS<sub>۴</sub> و NRPS<sub>۸</sub>) با پتیدسنتازهای غیرریبوزومی شناخته‌شده در تولید آپیسیدین و سیدروفور همگونی بالایی نشان دادند. این یافته‌ها تنوع بالای مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه در *C. lindemuthianum* را نشان می‌دهد که احتمالاً در اختصاصیت میزبان، جذب آهن و بیماری‌زایی نقش کلیدی دارند. نتایج این پژوهش زیربنای مهمی برای مطالعات عملکردی آینده (حذف ژن، متابولومیک و آزمون‌های بیماری‌زایی) فراهم می‌کند تا نقش دقیق این خوشه‌ها در چرخه بیماری‌زایی و برهم‌کنش بیمارگر-میزبان روشن شود و به ابداع راهبردهای نوین مهار زیستی آنتراکنوز لوبیا کمک کند.

تاریخ دریافت: ۱ دی ۱۴۰۴  
تاریخ بازنگری: ۱۹ بهمن ۱۴۰۴  
تاریخ پذیرش: ۲۲ بهمن ۱۴۰۴

نحوه استناددهی: فاتحی، مطهره، شبانی، لیلا، رئیسی، سمیه، و سیاری، محمد. (۱۴۰۳). ساختار و تنوع ژن‌های پتیدسنتاز غیرریبوزومی (NRPS) در ژنوم *Colletotrichum lindemuthianum*، عامل آنتراکنوز لوبیا. بیماری‌های گیاهی، ۶۰(۴)، ۴۰۱-۴۲۰.

DOI:

10.22034/IJPP.2026.2021891.510



مجوز و حق نشر: © ۱۴۰۳ تمامی حقوق انتشار این مقاله متعلق به نویسنده است. انتشار این مقاله توسط انتشارات ماهر به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با گواهی (CC BY) 4.0 صورت گرفته است.

کلیدواژه‌گان: آپیسیدین، پتیدهای غیرریبوزومی، سیدروفور، *Colletotrichum lindemuthianum*

پپتید سنتتازهای غیرریبوزومی قادرند با استفاده از طیف گسترده‌ای از واحدهای آمینواسیدی از جمله فرم D آمینواسیدها یا آمینواسیدهای غیرپروتئینی، پپتیدهایی با فعالیت‌های زیستی بالقوه تولید کنند که در شکل‌گیری رابطه گیاه و بیمارگر قارچی تعیین‌کننده هستند (Walsh et al., 2013). مثال بارز، نوع خاصی از NRPها یعنی سیدروفور در قارچ *Fusarium graminearum* است که علاوه بر تسهیل جذب آهن در محیط کم آهن فراریشه، در بیماری‌زایی و گسترش عفونت در گندم نقش مستقیمی دارد (Greenshields et al., 2007). همچنین، در *Alternaria alternata*، NRPSها پیش‌سازهای سموم آلترناگرین را می‌سازند که علاوه بر ایجاد بافت‌مردگی در گیاه، سیگنال‌های دفاعی مبتنی بر سالیسیلیک اسید را سرکوب می‌کنند (Chen et al., 2013).

از آنجا که بیماری‌های قارچی در گیاهان زراعی، از جمله آنتراکنوز، منجر به کاهش قابل توجه کمیت و کیفیت محصول می‌شوند. در مواردی نیز روش‌های رایج مقابله با این بیماری‌ها، مانند تولید بذر عاری از بیمارگر، استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی، تناوب کشت و استفاده از رقم‌های مقاوم گیاهی، با چالش‌هایی مواجه است. بنابراین به نظر می‌رسد شناخت ژن‌های مؤثر در بیماری‌زایی قارچ‌ها منجر به ارائه راهکارهایی مؤثر نظارتی بر بیمارگر گردد و بتواند در مهار بیماری‌های قارچی گیاهان زراعی مؤثر واقع شود (Milgroom & Fry, 1997; Pastor-Corrales, 2004). طبق داده‌های موجود در وبسایت GenBank، ژنوم‌های ۸۴ گونه از جنس *Colletotrichum* تا سال ۲۰۲۴ توالی‌یابی شده‌اند (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome). با این حال، تنها درصد کمی از آنها برای عملکردهای زیستی بالقوه‌شان مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. گونه‌های *Colletotrichum* شامل ۱۴ گونه مرکب/تبار و ۱۳ گونه منفرد است (Jayawardena et al., 2021). درک توصیف جامع گونه‌های عامل آنتراکنوز و پیشرفت روش‌های مولکولی شناسایی آنها برای ابداع راهبردهای

قارچ‌ها در طول تکامل خود، برای سنتز ترکیبات شیمیایی، مسیرهای پیچیده‌ای را به صورت جدا از مسیرهای متابولیک اصلی، ایجاد کرده‌اند. امروزه محصولات این مسیرها به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه شناخته می‌شوند. این مولکول‌ها در تعاملات بوم‌شناختی مانند رقابت با میکروارگانیسم‌های دیگر، مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی، و حتی ایجاد همزیستی نقش دارند (Bills & Gloer, 2016; Keller, 2019). بسیاری از موفقیت‌های بوم‌شناختی در قارچ‌های رشته‌ای نیز مرهون به‌کارگیری متابولیت‌های ثانویه در شیوه‌ی زندگی نفوذی و جذبی آنهاست. متابولیت‌های ثانویه به طور خاص در مراحل اولیه‌ی عفونت (مرحله‌ی زیواپروری) برای نفوذ و کلونیزه شدن قارچ در میزبان زنده مؤثر هستند (Jaswal et al., 2020). قارچ‌های بیمارگر گیاهی نیز در طول تهاجم به میزبان از متابولیت‌های ثانویه بهره می‌برند تا دفاع ذاتی گیاه را بی‌اثر سازند، ساختارهای سلولی را تخریب کنند یا حتی سیگنال‌های ایمنی میزبان را دستکاری نمایند (Bills & Gloer, 2016).

در قارچ‌ها متابولیت‌های ثانویه را می‌توان از نظر تفاوت در ساختار شیمیایی در پنج گروه متابولیت‌های مشتق از شیکیمات، پلی‌کتیدها، ترپنوئیدها و پپتیدهای غیرریبوزومی (NRPs = non-ribosomal peptides) دسته‌بندی کرد. متابولیت‌های ثانویه با وجود تنوع چشمگیر در ساختار شیمیایی و فعالیت زیستی ویژگی‌های مشترکی نیز دارند. یکی از ویژگی‌های مشترک آنها این است که ژن‌های رمزگذار اجزای تعاملی مؤثر در مسیر بیوسنتز این متابولیت‌ها، به‌طور پیوسته روی کروموزوم‌ها و در قالب خوشه‌های ژنی قرار می‌گیرند (Bills & Gloer, 2016). در این میان، پپتید سنتتازهای غیرریبوزومی (NRPS = non-ribosomal peptide synthetases) به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین ژن‌های بیوسنتزی، نقشی اساسی در ساخت ترکیبات بیماری‌زای قارچی ایفا می‌کنند (Wiemann & Keller, 2020).

(Sayari et al., 2025). در این پژوهش نیز خوشه‌های ژنی دارای ژن *NRPS* در قارچ *C. lindemuthianum*، عامل آنتراکنوز در *Phaseolus vulgaris*، شناسایی شد و جایگاه ژن *NRPS* و سایر ژن‌ها در خوشه‌های ژنی با به‌کارگیری روش‌های بیوانفورماتیک مورد بررسی قرار گرفت. به منظور شناسایی دقیق‌تر نوع NRP‌های سنتز شده توسط قارچ مذکور روابط فیلوژنتیک بین این قارچ و گونه‌های مشابه نیز بررسی شد. اگرچه نتایج این پژوهش اطلاعات خوبی در ارتباط با انواع NRP‌های مؤثر در بیماری‌زایی قارچ مذکور در اختیار می‌گذارد اما باید توجه داشت بسیاری از خوشه‌های ژنی متابولیت‌های ثانویه در شرایط استاندارد آزمایشگاهی غیرفعال باقی می‌مانند و تنها در حضور سیگنال‌های گیاهی مانند ترشحات ریشه یا مولکول‌های الیستور بیان می‌شوند (Brakhage & Schroeckh, 2021). این وابستگی محیطی، اهمیت مطالعات ترکیبی ژنومیک-فیزیولوژیک را آشکار می‌سازد؛ چرا که درک چگونگی بیان این خوشه‌ها در پاسخ به سیگنال‌های گیاهی می‌تواند به طراحی راهبردهای نوین مقابله با بیماری‌ها از جمله مهار هدفمند *NRPS* کمک کند.

## مواد و روش‌ها

توالی ژنوم و پیش‌بینی ژن‌های *NRPS* در *Colletotrichum lindemuthianum* در این مطالعه از کل توالی ژنوم گونه *C. lindemuthianum* با رس-شمار GCA\_001693025 (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) استفاده شد. برای شناسایی ژن‌ها یا خوشه‌های ژنی بالقوه *NRPS*، فایل توالی-های برابند ژنوم *C. lindemuthianum* با استفاده از فراسنج‌های پیش‌فرض و با دقت تشخیص متوسط به (antiSMASH (v7.1.0) (Blin et al., 2023) ارسال شد. سرویس وب antiSMASH توالی‌های برابند بالقوه‌ای را که خوشه‌های ژنی متابولیت ثانویه قارچی را رمزگذاری می‌کنند

مهار مؤثر ضروری است. ژنوم‌های گونه‌های *Colletotrichum* به دلیل فراوانی بالای ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی، مانند آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی گیاهی (Plant cell wall-degrading enzymes= PCWDEs)، پروتازها، آنزیم‌های بیوسنتز متابولیت ثانویه و عوامل مؤثر ترشح‌شده (Rao & Nandineni, 2017) قابل توجه هستند. در *C. truncatum*، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه توسط ۵۰ ژن *PKS* (۴۷ ژن *PKS* و ۳ ژن شبه *PKS*)، ۲۷ ژن *NRPS* (۱۷ ژن *NRPS* و ۱۰ ژن شبه *NRPS*)، ۹ ژن *DMAT* و ۴ ژن دورگ *PKS-NRPS* تسهیل می‌شود. هجده ژن اولیه مسئول سنتز متابولیت‌های ثانویه از طریق واکاوی ارتولوگ در تمام گونه‌های *Colletotrichum* شناسایی شدند، از جمله شش ژن *PKS*، هشت ژن *NRPS* و چهار ژن *DMAT* (Rao & Nandineni, 2017). یک بررسی جامع ژنومیک در سراسر ۱۱۵۹۸ ژنوم قارچی، ۲۹۳۹۲۶ Biosynthetic gene clusters= BGC را شناسایی کرد که در ۲۶۸۲۵ Gene cluster families= GCFs خوشه‌بندی شدند. به ویژه، کمتر از یک درصد محصولات طبیعی شناخته شده با این ترکیبات مطابقت داشتند که نشان‌دهنده قابلیت متابولیت ثانویه به ویژه در جنس‌هایی از جمله *Colletotrichum* تا حد زیادی دست نخورده است (Zhang et al., 2024). علاوه بر این، اخیراً بر اساس یک بررسی جامع شامل ۱۳۱۲۵ ژنوم قارچی، ۳۰۳۹۸۳ BGC را که در ۴۳۹۸۴ GCF گروه‌بندی شده‌اند، گزارش شد که ۹۹/۶٪ آنها هنوز مشخص نشده‌اند. این مطالعه همچنین ۳۵۹ Cyclopeptide synthases =CDPS و ۹۴۸۲ *NRPS* را شناسایی کرد که تنوع بیوسنتز دیکتوپپیرازین را در بین گونه‌های قارچی، به ویژه در گونه‌های *Fusarium*، *Colletotrichum* و *Aspergillus* برجسته می‌کند (Wei et al., 2025).

امروزه با ظهور فناوری‌های ژنومیک و ابزارهای پیش‌بینی محصول خوشه‌های بیوسنتزی مانند antiSMASH و DeepBGC، شناسایی ژن‌های *NRPS* در ژنوم قارچ‌های بیمارگر گیاهی به سرعت پیشرفت کرده است

دامانه‌های مختلفی مانند آدنیلایسیون (A)، پروتئین حامل پپتیدیل (PP)، تراکم (C) و سینوکروم (P450) بود.

ژن‌های درون خوشه تعریف شده برای وجود دامانه‌های معمول NRPS که نشان‌دهنده آنزیم‌های بیوسنتز NRP هستند (Hoffmeister & Keller, 2007) از طریق یک ابزار واکاوی آنلاین (وبسایت واکاوی PKS/NRPS (<http://nrps.igs.umaryland.edu>)) بررسی شدند. فقط ژن‌هایی که حداقل یک پودمان (module) آن‌ها هر سه دامانه حفاظت شده (A, T= Thiolation و C) را نشان می‌داد، به عنوان ژن‌های NRPS فرضی شناسایی شدند. سازماندهی پودمان NRPS از نتایج واکاوی استنباط شد. یک ژن NRPS فرضی در صورتی تأیید می‌شد که حداقل یک پودمان حاوی هر سه دامانه حفاظت شده (A, T و C) داشته باشد (Rausch et al., 2007). نتایج این واکاوی همچنین برای استنباط سازماندهی پودمان NRPS استفاده شد.

### واکاوی فیلوژنتیکی NRPS نامزد کامل گونه *C. chrysophilum*

از آنجایی که دامانه A، حفاظت شده‌ترین دامانه در ژن‌های NRPS قارچی است (Cramer Jr et al., 2006)، روابط تکاملی ارتولوگ‌های NRPS فرضی با استفاده از توالی‌های پروتئینی دامانه‌های A از ژن‌های NRPS تک و چندپودمانی به عنوان مرجع بررسی شد. توالی‌های پروتئینی از این مطالعه و پایگاه داده NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) تحت واکاوی فیلوژنتیکی قرار گرفتند. پروتئین‌های NRPS دامانه A شناسایی شده *Colletotrichum* به عنوان توالی مرجع جست‌وجو برای انجام جست‌وجوهای BLASTp در پایگاه داده GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) استفاده شدند. پروتئین‌هایی با مقدار مورد انتظار کمتر از ۰/۰۰۰۰۰۱ در واکاوی استفاده شدند. فیلوژنی‌ها با استفاده از روش پیوست همسایه‌ها (neighbor-joining) با مدل‌های جایگزینی

(از جمله آن‌هایی را که شامل NRPS هستند)، شناسایی می‌کند. علاوه بر این، ما Qiagen CLC Genomics Workbench نسخه ۲۱.۰.۱ (Bioinformatics, Aarhus, Denmark) را برای تأیید ژن‌های NRPS خوشه‌های ژنی تعریف شده توسط antiSMASH و دامانه‌های (domains) موجود در این خوشه‌ها پیاده‌سازی کردیم. همه خوشه‌ها و ساختارهای دامانه-ای NRPS پیش‌بینی شده به صورت دستی ارزیابی شدند. جست‌وجوهای شباهت tBLASTn (با توالی‌های پروتئینی NRPS *C. chrysophilum*) و BLASTp در پایگاه داده توالی پروتئینی غیرتکراری NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) برای این بررسی انجام شد. در این پژوهش، ژن‌های که شباهت بیش از ۶۰ درصد در واکاوی BLAST داشتند و ساختارهای دامانه‌ای مشابهی را نشان می‌دادند، همگون در نظر گرفتیم.

### شناسایی متابولیت‌های ثانویه کاتالیز شده توسط خوشه NRPS

خوشه‌های NRPS در توالی‌های برایند *Colletotrichum lindemuthianum* شناسایی شده توسط antiSMASH به صورت دستی حاشیه‌نویسی شدند. توالی‌های برایند با استفاده از سرویس وب AUGUSTUS (<http://augus.gobics.de>) با مدل‌های ژن *Verticillium longisporum* و تنظیمات پیش‌فرض برنامه حاشیه‌نویسی شدند. ما ساختارهای دامانه‌ای آن‌ها را واکاوی کردیم تا شباهت بین ژن‌های NRPS *Colletotrichum lindemuthianum* و ژن‌های گزارش شده قبلی را بهتر درک کنیم.

وبسایت واکاوی PKS/NRPS<sup>1</sup> (Bachmann & Ravel, 2009) و پایگاه داده دامانه‌های حفاظت شده NCBI برای توصیف دامانه‌ها در این ژن‌ها استفاده شدند (Marchler-Bauer et al., 2010). این واکاوی شامل

<sup>1</sup> <http://nrps.igs.umaryland.edu/nrps>

NRPS13، NRPS14، NRPS10 و NRPS11 هستند. در جداول ۱ و ۲ اندازه و توالی دامانه‌ای پروتئین‌های NRPS تک‌پودمانی و چندپودمانی C. *lindemuthianum* با بالاترین برخورد حاصل از BLASTp در پایگاه داده‌ی NCBI مقایسه شده است.

#### واکاوی فیلوژنتیکی

واکاوی فیلوژنتیکی ۱۴ NRPS با در نظر گرفتن شباهت توالی دامانه‌ای آن‌ها منجر به شناسایی ۱۴ گروه گردید. خوشه NRPS3 به همراه NRPS گونه‌های *C. spinosum* (TDZ32392)، *C. orbicularis* (TDZ15947)، *D. citri* (XP\_043019359)، *Gnomoniopsis* sp. (KAJ4419141)، *Bipolaris maydis* (KAH7562946)، *Pyrenophora tritici-repentis* (KAI1673238) و *Ascochyta lentis* (KAF9698015) در گروه A قرار گرفت. توالی دامانه‌ای این گروه به صورت PP-C-A-PP-C-A-PP بود. این گروه ترکیب شیمیایی خاصی را سنتز نمی‌کند (شکل ۱).

خوشه NRPS6 به همراه NRPS گونه‌های *C. spinosum* (TDZ34689)، *C. orbicularis* (TDZ25090)، *V. nonalfalfae* (XP\_028492282)، *V. dahliae* (KAH6704949) و *V. longisporum* (KAG7115229) در گروه B قرار گرفت. توالی دامانه‌ای این گروه به صورت A-PP-C-PP بود. این گروه ترکیب شیمیایی خاصی را سنتز نمی‌کند (شکل ۱).

خوشه NRPS2 به همراه NRPS گونه‌ی *Thozetella* sp. (KAH8893464) در گروه C قرار گرفت. توالی دامانه‌ای این گروه به صورت A-PP-C-A-E بود. این گروه ترکیب شیمیایی خاصی را سنتز نمی‌کند (شکل ۱).

پروتئین (WAG + I + G) برای ژن‌های NRPS تک‌پودمانی و Dayhoff + G (برای ژن‌های NRPS چندپودمانی) از طریق MEGA نسخه ۷ (Kumar et al., 2016) ساخته شدند. از هزار تکرار کاذب برای واکاوی بوت‌استرپ برای تخمین پشتیبانی شاخه با فراسنجه‌های مدل یکسان استفاده شد. برای طبقه‌بندی ژن‌های NRPS به زیرشاخه‌های مجزا، ما از یک رویکرد یکپارچه استفاده کردیم که سه معیار را با هم ترکیب می‌کرد: (۱) خوشه‌بندی فیلوژنتیکی بر اساس شباهت توالی اسید آمینه دامانه A با پشتیبانی بوت‌استرپ قوی ( $\leq 70\%$ )؛ (۲) شباهت در ساختار دامانه (به عنوان مثال، پودمان‌های A-T-C، وجود دامانه‌های اضافی مانند اپیمریزاسیون یا Sid)؛ و (۳) حفظ هم-رشتگی (synteny) ژن در خوشه‌های ژنی NRPS در گونه‌های مختلف. تبارها فقط زمانی تعریف می‌شدند که هر سه معیار برآورده می‌شدند و سازگاری در زمینه‌های تکاملی، ساختاری و ژنومی تضمین می‌شد.

#### نتایج

##### شناسایی خوشه‌های NRPS و سازمان‌دهی دامانه‌ها در ژنوم C.

##### *lindemuthianum*

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده حاصل از بررسی ژنوم قارچ C. *lindemuthianum* توسط نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 21 و نرم‌افزار همگام antiSMASH 7.0.1 (online)، ۳۳ خوشه ژنی بالقوه‌ی حاوی ژن NRPS تشخیص داده شد. بررسی‌های بیش‌تر نشان داد تعداد ۱۴ خوشه ژنی به طور حتم دارای ژن NRPS و دامانه A بودند. ۹ مورد علاوه بر دامانه A دامانه‌های C و PP را نیز داشتند. دو مورد توالی دامانه A-PP-E (Epimerization=E)، یک مورد توالی دامانه A-PP-Te (Thioesterase=Te) و دو مورد تنها دامانه A را داشتند. از این ۱۴ NRPS، ۸ مورد چندپودمانی (NRPS3، NRPS2، NRPS12، NRPS7، NRPS4، NRPS8، NRPS1، NRPS5 و NRPS6) و ۶ مورد تک‌پودمانی (NRPS9، NRPS10، NRPS11، NRPS13، NRPS14، NRPS15، NRPS16، NRPS17، NRPS18، NRPS19، NRPS20، NRPS21، NRPS22، NRPS23، NRPS24، NRPS25، NRPS26، NRPS27، NRPS28، NRPS29، NRPS30، NRPS31، NRPS32، NRPS33، NRPS34، NRPS35، NRPS36، NRPS37، NRPS38، NRPS39، NRPS40، NRPS41، NRPS42، NRPS43، NRPS44، NRPS45، NRPS46، NRPS47، NRPS48، NRPS49، NRPS50، NRPS51، NRPS52، NRPS53، NRPS54، NRPS55، NRPS56، NRPS57، NRPS58، NRPS59، NRPS60، NRPS61، NRPS62، NRPS63، NRPS64، NRPS65، NRPS66، NRPS67، NRPS68، NRPS69، NRPS70، NRPS71، NRPS72، NRPS73، NRPS74، NRPS75، NRPS76، NRPS77، NRPS78، NRPS79، NRPS80، NRPS81، NRPS82، NRPS83، NRPS84، NRPS85، NRPS86، NRPS87، NRPS88، NRPS89، NRPS90، NRPS91، NRPS92، NRPS93، NRPS94، NRPS95، NRPS96، NRPS97، NRPS98، NRPS99، NRPS100) بودند.



*coarctata* در این گروه به صورت PP-C-A-PP-C، توالی دامانه‌ای *A.* و *C. orbiculare* *Xylariales* sp. AK1849 به صورت C-A-PP-C و *tanneri* به صورت PP-C-A-PP بود. این گروه ترکیب شیمیایی خاصی را سنتز نمی‌کنند.

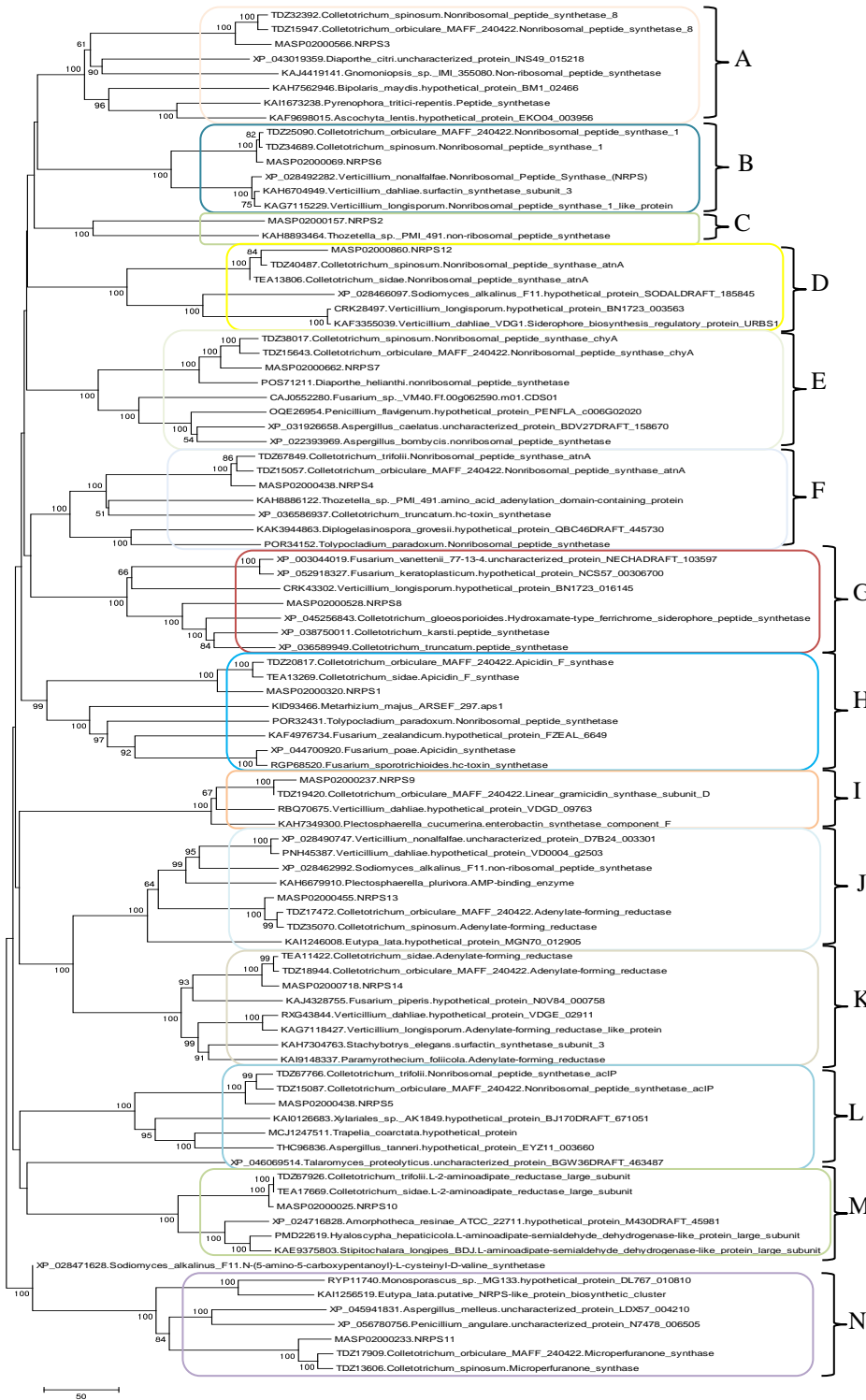
خوشه NRPS10 به همراه NRPS گونه‌های *C. sidae* *Hyaloscypha* (TEA17669)، *C. trifolii* (TDZ67926)، *Amorphotheca resinae* (PMD22619) *hepaticicola* (XP\_024716828) و *Stipitochalara longipes* (KAE9375803) در گروه M قرار گرفت. توالی دامانه‌ای این گروه به صورت A-PP-E بود. این گروه ترکیب شیمیایی خاصی را سنتز نمی‌کنند (شکل ۱).

خوشه NRPS11 به همراه NRPS گونه‌های *C. spinosum* *E. lata* (TDZ17909) *C. orbiculare* (TDZ13606) *P. angulare* (XP\_028462992) *A. melleus* (KAI1256519) (XP\_056780756) و *Monosporascus* sp. (RYP11740) در گروه N قرار گرفت. توالی دامانه‌ای این گروه به صورت A-PP-Te بود. این گروه ترکیب شیمیایی خاصی را سنتز نمی‌کنند (شکل ۱).

خوشه NRPS13 به همراه NRPS گونه‌های *C. spinosum* *Eutypa lata* (TDZ17472) *C. orbiculare* (TDZ35070) *P. plurivora* (XP\_028462992) *S. alkalinus* (KAI1246008) *V. dahliae* و *V. nonalfalfae* (XP\_028490747) (KAH6679910) (PNH45387) در گروه J قرار گرفت. این گروه تنها یک دامانه A دارند و ترکیب شیمیایی خاصی را سنتز نمی‌کنند (شکل ۱).

خوشه NRPS14 به همراه NRPS گونه‌های *C. sidae* (TEA11422) *V. longisporum* (KAG7118427) *F. piperis* (TDZ18944) *C. orbiculare* (KAI4328755) *Stachybotrys elegans* (KAH7304763) و *Paramyrothecium dahliae* (RXG43844) در گروه K قرار گرفت. این گروه تنها یک دامانه A دارند و ترکیب شیمیایی خاصی را سنتز نمی‌کنند (شکل ۱).

خوشه NRPS5 به همراه NRPS گونه‌های *C. trifolii* (TDZ67766) *Xylariales* sp. AK1849 (TDZ15087) *C. orbiculare* (KAI0126683) *A. tanneri* (MCJ1247511) *Trapelia coarctata* (XP\_046069514) *Talaromyces proteolyticus* (THC96836) در گروه L قرار گرفت. توالی دامانه‌ای NRPS5، *C. trifolii* و *T.*



شکل ۱ - روابط فیلوژنتیکی توالی دامانه A خوشه‌های ژنی NRPS با استفاده از روش پیوست همسایه‌ها. مقادیر پشتیبان بوت‌استرپ (۱۰۰۰ تکرار) در گره‌ها

نشان داده شده است. نوار مقیاس تعداد جانشینی در هر جایگاه را نشان می‌دهد. خوشه‌های شناسایی شده با حروف بزرگ نشانه‌گذاری شده‌اند.

Figure 1: Phylogenetic relationships of the A domain sequence from NRPS gene clusters analyzed in this study. The tree was constructed using the Neighbor-Joining method. Bootstrap values (1000 replicates) are indicated at the nodes, representing branch support. Scale bar indicates the number of substitutions per site. Capital letters mark the identified clusters.

خوشه NRPS11 تک‌پودمانی در گروه N یافت شد. این ژن رمزگذار

دامانه‌های پروتئینی آدنیلایسیون، حامل پپتیدیل و تیواسترازی به ترتیب A-PP-

Te و کاملاً مشابه ژن‌های NRPS گزارش شده برای گونه‌های *C. spinosum*

*A. melleus*، (TDZ13606)، *C. orbiculare*، (TDZ17909)،

و *P. angulare*، (XP\_028462992)، *P. angulare*، (XP\_056780756) و

*E. lata* گروه *Monosporascus* sp. (RYP11740) بود. در این گروه

(KAI1256519) فاقد دامانه حامل پپتیدیل بود.

هشت ژن NRPS چندپودمانی در گروه‌های A، C، D، E، F، G، H، L

شناسایی شدند (شکل ۱). NRPS3 به عنوان یک NRPS چندپودمانی در گروه

A یافت شد. توالی دامانه‌ای این گروه کاملاً حفاظت شده و به صورت PP-C-

A-PP-C-PP بود. در این گروه NRPS گونه‌های *C. spinosum*

*D. citri*، (TDZ32392)، *C. orbiculare*، (TDZ15947)

*Gnomoniopsis* sp. IMI 355080، (XP\_043019359)،

*P. tritici-repentis*، (KAJ4419141)، *B. maydis*، (KAH7562946)،

و *A. lentis* (KAF9698015) نیز یافت شد.

خوشه NRPS12 به عنوان یک NRPS چندپودمانی در گروه D یافت

شد. توالی دامانه‌ای این گروه کاملاً حفاظت شده و به صورت PP-C-A-PP-

C و مشابه NRPS یافت شده برای گونه‌های *C. spinosum*، (TDZ40487)،

*V. longisporum*، (XP\_028466097)، *S. alkalinus*، (TEA13806)،

و *dahliae*، (KAF3355039)، *V. longisporum*، (CRK28497) بود.

توالی پیش‌بینی شده برای این گروه نیز فاقد دامانه آدنیلایسیون در ابتدای توالی

دامانه‌ای است.

خوشه NRPS2 به عنوان یک NRPS چندپودمانی در گروه C یافت شد.

توالی دامانه‌ای این NRPS مشابه NRPS یافت شده برای گونه‌ی

*Thozetella* sp. PMI\_491 (KAH8893464) بود. توالی دامانه‌ای این

گروه کاملاً حفاظت شده و به صورت A-PP-C-A-E بود.

شش ژن NRPS تک‌پودمانی در گروه‌های B، I، J، K، M و N شناسایی

شدند (شکل ۱). NRPS6 تک‌پودمانی در گروه B یافت شد. این ژن رمزگذار

دامانه‌های پروتئینی آدنیلایسیون، تراکمی و حامل پپتیدیل به ترتیب A-PP-C-

PP و کاملاً مشابه ژن‌های NRPS گزارش شده برای گونه‌های *C. spinosum*

*V. nonalfalfae*، (TDZ25090)، *C. orbiculare*، (TDZ34689)

و *V. dahliae*، (XP\_028492282)، *V. dahliae*، (KAH6704949)، و

*longisporum* (KAG7115229) بود.

سازمان‌دهی دامانه‌های ژنی NRPS تک‌پودمانی در گروه I و M شامل

دامانه‌های آدنیلایسیون، حامل پپتیدیل و اپیمیرزاسیون، به شدت حفاظت شده

بود و ترتیب دامانه‌ها در هر دو گروه یکسان و به صورت A-PP-E و مشابه

ژن‌های NRPS گزارش شده برای گونه‌های *C. orbiculare*، (TDZ19420)،

*V. dahliae*، (RBQ70675)، *P. cucumerina*، (KAH7349300)،

*H. hepaticicola*، (TDZ67926)، *C. trifolii*، (TEA17669)،

و *S. longipes*، (XP\_024716828)، *A. resinae*، (PMD22619)

(KAE9375803) بود.

سازمان‌دهی دامانه‌های ژنی NRPS تک‌پودمانی در گروه J و K تنها شامل

دامانه آدنیلایسیون (A) و به شدت حفاظت شده و مشابه ژن‌های NRPS

گزارش شده برای گونه‌های *C. spinosum*، (TDZ35070)، *C. orbiculare*

و *E. lata*، (TDZ17472)، *C. alkalinus*، (KAI1246008)

و *V. nonalfalfae*، (KAH6679910)، *P. plurivora*، (XP\_028462992)

و *C. sidae*، (PNH45387)، *V. dahliae*، (XP\_028490747)

و *C. orbiculare*، (TEA11422)، *F. piperis*، (TDZ18944)

و *V. longisporum*، (RXG43844)، *V. dahliae*، (KAJ4328755)

و *P. foliicola*، (KAH7304763)، *S. elegans*، (KAG7118427)

(KAI9148337) بود.

*F. orbiculare* (TDZ20817)، *M. majus* (KID93466)،

*F. zealandicum* (KAF4976734)، *F. poae* (XP\_044700920) و *sporotrichioides* (RGP68520) بود.

توالی دامانه‌ای NRPS5 در گروه L مشابه NRPS گونه‌های *C. trifolii* (TDZ67766) و *T. coarctata* (MCJ1247511) به صورت PP-C-A-PP-C بود. توالی دامانه‌ای NRPS گونه‌ی *A. tanneri* (THC96836) به صورت PP-C-A-PP-C و توالی دامانه‌ای NRPS گونه‌های *C. orbiculare* (TDZ15087) و *Xylariales sp.* AK1849 (KAI0126683)، به صورت C-A-PP-C بود.

پیش‌بینی ژن‌های خوشه‌های ژنی NRPS در *C. lindemuthianum*

مقایسه‌ی خوشه‌های ژنی NRPS *C. lindemuthianum* و *F. poae* نشان داد ژن‌های اصلی و مشترک از جمله NRPS، سیتوکروم P450، اکسیداز وابسته به FAD، آمینوترانس‌فراز، آکسیدورداکتاز، فتی‌اسید سنتاز، حامل و سازه ترانویسی در هر دو خوشه وجود دارد (شکل ۲). محصول خوشه‌های ژنی بیوسنتزی پیش‌بینی شده (*F. poae* XP\_044700920) با تعیین توالی ژنوم به عنوان آپیسیدین سنتاز شناسایی شده است. ترتیب ژن‌های اصلی در دو خوشه تفاوت‌هایی را نشان داد. همچنین تفاوت‌هایی بین ژن‌های اطراف ژن-های اصلی در دو خوشه دیده شد. بر این اساس یک مورد از توالی‌های برابری پیش‌بینی شده (شامل NRPS1) دارای یک خوشه‌ی ژنی بیوسنتزی کاربردی است که حاوی هم‌تاهای ژن‌های مرتبط با تولید آپیسیدین بود.

خوشه NRPS7 به عنوان یک NRPS چندپودمانی در گروه E یافت شد

توالی دامانه‌ای این NRPS و NRPS گونه‌های *C. spinosum* (TDZ38017)، *C. orbiculare* (TDZ15643) به صورت A-PP-C-A-PP-C و توالی دامانه‌ای NRPS گونه‌های *D. helianthi* (POS71211)، *Fusarium sp.* VM40 (CAJ0552280)، *A. bombycis* (XP\_031926658) و *A. caelatus* (OQE26954) (XP\_022393969) فاقد دامانه C پایانی بود. مشابه این توالی فاقد دامانه C پایانی در گروه F نیز برای NRPS4 و NRPS گونه‌های *C. trifolii* (TDZ67849)، *C. orbiculare* (TDZ15057)، *Thozetella sp.* (KAK3944863) و *D. grovesii* (KAH8886122) PMI\_491 *truncatum* (XP\_036586937) نیز یافت شد.

توالی دامانه‌ای در گروه G کم‌تر حفاظت شده بود. توالی دامانه‌ای NRPS8 و NRPS گونه‌های *F. vanettenii* (XP\_003044019) و *keratoplasticum* (XP\_052918327) به صورت A-C-A-PP-C-PP-C-A-C-PP-C-PP بود و یک دامانه حامل پیتیدیل در اولین و آخرین پودمان کم‌تر از NRPS گونه‌های مشابه داشت به این صورت که توالی دامانه‌ای NRPS گونه‌های *C. karsti* (XP\_038750011) و *C. truncatum* (XP\_036589949) و *C. gloeosporioides* (XP\_045256843) A-PP-C-A-PP-C-PP-C-PP بود.

توالی دامانه‌ای NRPS1 در گروه H به صورت A-PP-C-C-A-PP-C-A-PP-C-PP و مشابه NRPS گونه‌های *C. sidae* (TEA13269)،



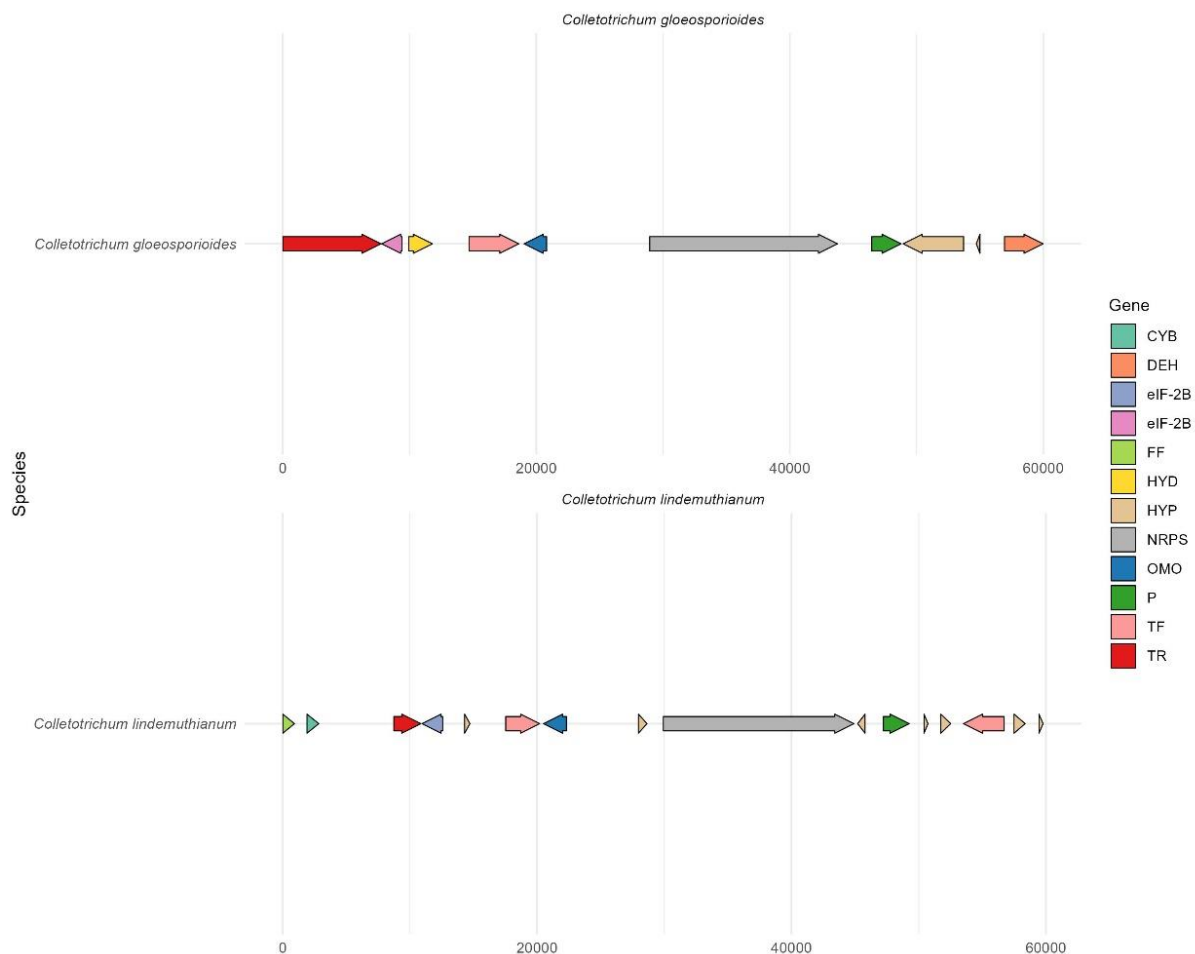
شکل ۲ - مقایسه‌ی خوشه‌های ژنی NRPS *Fusarium poae* و *Colletotrichum lindemuthianum*

AT, aminotransferase; CYP, cytochrome P450; FADO, FAD-dependent oxidase; FAS, fatty acid synthase; HYP, hypothetical protein; MT, methyl transferase; NRPS, Nonribosomal Peptide Synthetase; OXR, oxidoreductase; TF, transcription factor; TR, transporter.

Figure 2: Comparison of NRPS gene clusters of *Colletotrichum lindemuthianum* and *Fusarium poae*. AT, aminotransferase; CYP, cytochrome P450; FADO, FAD-dependent oxidase; FAS, fatty acid synthase; HYP, hypothetical protein; MT, methyl transferase; NRPS, Nonribosomal Peptide Synthetase; OXR, oxidoreductase; TF, transcription factor; TR, transporter.

سنتاز شناسایی شده است. ترتیب ژن‌های اصلی در دو خوشه تفاوت‌هایی را نشان داد. هم‌چنین تفاوت‌هایی بین ژن‌های اطراف ژن‌های اصلی در دو خوشه دیده شد. بر این اساس یک مورد از توالی‌های برابری پیش‌بینی شده (شامل NRPS8) دارای یک خوشه‌ی ژنی بیوستتزی کاربردی است که حاوی هم‌تاهای ژن‌های مرتبط با تولید سیدروفورها بود.

مقایسه‌ی خوشه‌های ژنی NRPS قارچ *C. lindemuthianum* و *C. gloeosporioides* نشان داد ژن‌های اصلی و مشترک از جمله NRPS، ارنیتین اُکسیژناز، سازه آغازگر ترجمه، پروتئیناز، حامل و سازه ترانسپوزی در هر دو خوشه وجود دارد (شکل ۳). محصول خوشه‌های ژنی بیوستتزی پیش‌بینی شده *C. gloeosporioides* با تعیین توالی ژنوم به عنوان سیدروفور



شکل ۳- مقایسه‌ی خوشه‌های ژنی NRPS *Colletotrichum gloeosporioides* و *Colletotrichum lindemuthianum*

CYB, Cytochrome b561; DEH, dehydratase; eIF-2B , translation initiation factor; FF, ff domain protein; HYD, hydrolase; HYP, hypothetical protein; NRPS, Nonribosomal Peptide Synthetase; OMO, ornithine monooxygenase; OXR, oxidoreductase; P, proteinase; TF, transcription factor; TR, transporter.

Figure 3: Comparison of NRPS gene clusters of *Colletotrichum lindemuthianum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. CYB, Cytochrome b561; DEH, dehydratase; eIF-2B , translation initiation factor; FF, ff domain protein; HYD, hydrolase; HYP, hypothetical protein; NRPS, Nonribosomal Peptide Synthetase; OMO, ornithine monooxygenase; OXR, oxidoreductase; P, proteinase; TF, transcription factor; TR, transporter.

آپیسیدین سنتاز (نوعی HC-Toxin) شناسایی شده است. ترتیب و تعداد ژن‌های اصلی در دو خوشه تفاوت‌هایی را نشان داد. بر این اساس یک مورد از توالی‌های برابری پیش‌بینی شده (شامل NRPS4) دارای یک خوشه‌ی ژنی بیوسنتزی کاربردی است که حاوی هم‌تاهای ژن‌های مرتبط با تولید آپیسیدین بود.

مقایسه‌ی خوشه‌های ژنی NRPS قارچ *C. lindemuthianum* و *C. orbiculare* نشان داد ژن‌های اصلی و مشترک از جمله NRPS، سیتوکروم P450، اکسیداز وابسته به FAD، اکسیدورداکتاز، حامل و سازه ترانویسی در هر دو خوشه وجود دارد (شکل ۴). محصول خوشه‌های ژنی بیوسنتزی پیش‌بینی شده *C. orbiculare* با تعیین توالی ژنوم به عنوان



شکل ۴ مقایسه‌ی خوشه‌های ژنی NRPS *Colletotrichum orbiculare* و *Colletotrichum lindemuthianum*

ABC transporter; AT, aminotransferase; CYP, cytochrome P450; DBP; Diphthamide biosynthesis protein; HSP, heat shock protein; FADO, FAD-dependent oxidase; FAS, fatty acid synthase; HYP, hypothetical protein; LIG, ligase; NRPS, Nonribosomal Peptide Synthetase; OXR, oxidoreductase; TE, thioesterase; TF, transcription factor; TR, transporter.

Figure 4: Comparison of NRPS gene clusters of *Colletotrichum lindemuthianum* and *Colletotrichum orbiculare*. ABC transporter; AT, aminotransferase; CYP, cytochrome P450; DBP; Diphthamide biosynthesis protein; HSP, heat shock protein; FADO, FAD-dependent oxidase; FAS, fatty acid synthase; HYP, hypothetical protein; LIG, ligase; NRPS, Nonribosomal Peptide Synthetase; OXR, oxidoreductase; TE, thioesterase; TF, transcription factor; TR, transporter.

این ژن‌ها با دامانه تراکمی (C) یا شبه‌تراکمی خاتمه می‌یابند. این ساختار غیرمعمول، سازوکار جایگزینی برای آزادسازی پپتید نهایی را پیشنهاد می‌کند که ممکن است مختص برخی گونه‌ها یا خانواده‌های ژنی باشد. مشاهدات مشابه در *Ceratocystidaceae* (Sayari et al., 2019) و *Aspergillus/Penicillium* (Gibson et al., 2014) نیز گزارش شده که دامانه‌های C-آبه‌جای دامانه تراکمی قرار دارند و نشان‌دهنده عملکرد تکراری (iterative) این NRPS هاست.

## بحث

خوشه‌های ژنی NRPS در قارچ بیماری‌گر *Colletotrichum lindemuthianum* پیش از این مطالعه به‌خوبی شناخته نشده بودند. در این پژوهش، ۱۴ ژن NRPS شناسایی شد که شامل ۶ ژن تک‌پودمانی و ۸ ژن چندپودمانی بود. تنوع تعداد و ساختار NRPS در قارچ‌های مختلف می‌تواند با تفاوت در راهبردهای بیماری‌زایی، سازگاری با میزبان و شرایط محیطی مرتبط باشد (Sayari et al., 2025). یافته جالب توجه، حضور دامانه PP به‌عنوان دامانه انتهایی در ۴ ژن NRPS چندپودمانی بود، در حالی که معمولاً

تکامل سریع و از دست رفتن عملکردی این مسیر در برخی گونه‌های *Colletotrichum* است.

خوشه NRPS8 (۱۶ ژن) بیشترین شباهت را با خوشه سیدروفورستتاز *C. gloeosporioides* داشت (Sayari et al., 2025) و حاوی ژن‌های حفاظت‌شده از جمله ال‌اُورنتین‌ان‌پنج مونوهیدروژناز، (SidA)، حامل و سازه ترانویسی بود. سیدروفورهای نوع هیدروکسامات برای جذب آهن در محیط‌های فقیر از آهن ضروری هستند و به‌عنوان فاکتور بیماری‌زایی شناخته می‌شوند (Caza & Kronstad, 2013; Haas et al., 2008) در قارچ *C. graminicola*. این سیدروفورها در فاز زیواپروری کاهش می‌یابند تا پاسخ ایمنی میزبان تحریک نشود، اما در فاز مرده‌پروری به شدت بیان می‌شوند (Albarouki et al., 2014). در یکی از گونه‌های جنس *Trichoderma*، سه NRPS مرتبط با تولید سیدروفور توسط Mukherjee و همکاران (Mukherjee et al., 2018) شناسایی شده است. نتایج این پژوهش همچنین حاکی از آن است که جهش یافته‌های *T. virens* فاقد ژن بیوسنتز سیدروفور داخل سلولی TvTex10، رشد سریعتر، کاهش اسپورزایی، حساسیت مغرط به تنش اُکسایشی و کاهش تولید گلیوتوکسین را نشان دادند اما میزان کلونیزاسیون در ریشه ی ذرت افزایش یافت. این جهش‌یافته‌ها در القای مقاومت سیستمیک در ذرت در برابر *Cochliobolus heterostrophus* دچار اختلال شدند که نشان‌دهنده ی نقش TvTex10 در متعادل کردن رشد، مقاومت در برابر تنش و فعال‌سازی مقاومت سیستمیک القایی است.

شباهت توالی دامانه‌ی NRPS8 با گونه‌های *Fusarium* بیشتر از سایرگونه‌های *Colletotrichum* می‌تواند بیانگر سازگاری‌های بوم‌شناختی مشابه یا انتقال افقی ژن باشد (Schmitt & Lumbsch, 2009). این یافته با گزارش‌های قبلی در مورد حفظ هموستازی آهن و نقش آن در بیماری‌زایی

واکاوای فیلوژنتیکی دامانه‌های آدنیلاسیون، ۱۴ تبار مجزا ایجاد کرد که برخی از آن‌ها با NRPS های شناخته‌شده همگونی بالایی نشان دادند؛ از جمله آپیسیدین‌ستتاز و فریکروم‌سیدروفورستتاز نوع هیدروکسامات، این دو گروه به‌دلیل نقش کلیدی در بیماری‌زایی، جذب آهن و تنظیم پاسخ‌های ایمنی میزبان، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند.

خوشه NRPS1 (۱۶ ژن) بیشترین شباهت را با خوشه آپیسیدین‌ستتاز *F. poae* داشت (Witte et al., 2021). ژن‌های حفاظت‌شده شامل سیتوکروم P450، اکسیداز وابسته به FAD، آمینوترانس‌فراز، اُکسیدورداکتاز، فتی‌اسید ستتاز، حامل و سازه ترانویسی بودند، اما ژن متیل‌ترانسفراز که برای متیلاسیون N-terminal آپیسیدین ضروری است، غایب بود. خوشه NRPS4 (۲۱ ژن) نیز با خوشه شبه‌آپیسیدین *C. orbiculare* همگونی بالایی نشان داد (Sayari et al., 2025)، ولی فاقد ژن‌های کلیدی متیل‌ترانسفراز، آمینوترانسفراز و فتی‌اسیدستتاز بود.

قارچ‌زهرهای دارای میزبان انتخابی به طور قابل توجهی به برهمکنش موفق بیمارگر با میزبان کمک می‌کنند زیرا این زهرابه‌ها بر روی میزبان انتخابی اثر می‌کنند (Walton, 2006). آپیسیدین یک زهرابه تتراپپتیدی حلقوی و مهارکننده هیستون داستیلاز (HDAC) است که در بیماری‌زایی قارچ‌های *Fusarium* و برخی *Colletotrichum* ها نقش دارد (Darkin-Rattray et al., 1996). فقدان ژن‌های کلیدی در *C. lindemuthianum* می‌تواند نشان‌دهنده مسیر جایگزین یا ناقص برای تولید ترکیبات شبه‌آپیسیدین باشد که احتمالاً با اختصاصیت میزبان لوبیا یا شدت بیماری‌زایی مرتبط است. در مطالعه Sayari et al. (2025) نیز بازآرایی‌های قابل توجهی در خوشه‌های شبه‌آپیسیدین گونه‌های *Colletotrichum* گزارش شده است و نشان دادند که برخی گونه‌ها مثل *C. nymphaeae* و *C. graminicola* کاملاً فاقد ژن NRPS آپیسیدین‌ستتاز هستند (Sayari et al., 2025). این یافته‌ها بیانگر

است. این یافته می‌تواند با اختصاصیت میزبان لوبیا و شدت بیماری‌زایی گونه مرتبط باشد. همچنین شناسایی خوشه NRPS8 با شباهت بالا به مسیر بیوسنتزی سیدروفورهای نوع هیدروکسامات (فریکروم) و حضور ژن‌های حفاظت‌شده مانند جمله ال اُورنتین این پنج مونوهیدروژناز، نقش کلیدی این مسیر در جذب آهن، تحمل گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر و تنظیم فازهای زیواپرووری/مرده‌پروری را تأیید می‌کند.

در مجموع، تنوع ساختاری و عملکردی ژن‌های NRPS در *C. lindemuthianum* نشان‌دهنده راهبردهای تکاملی پیچیده برای تولید متابولیت‌های ثانویه با نقش‌های احتمالی در بیماری‌زایی، رقابت میکروبی و سازگاری با میزبان است. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند به ابداع راهبردهای نوین مهار زیستی آنتراکنوز لوبیا کمک کند.

### تعارض منافع

در انجام مطالعه حاضر، هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد.

### موازین اخلاقی

در انجام این پژوهش تمامی موازین و اصول اخلاقی رعایت گردیده است.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد و با حمایت مالی دانشگاه شهرکرد گزنت شماره (GRD۳۴M۱۰۳۲۰) انجام شده است، که بدین وسیله قدردانی می‌گردد.

قارچ‌ها (Greenshields et al., 2007; Schrettl et al., 2007) همخوانی دارد.

در مجموع، شناسایی ۱۴ ژن NRPS با ساختارهای غیرمعمول و خوشه‌های شبه‌آپیسیدین و فریکروم در *C. lindemuthianum*، تنوع بالای مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه در این بیمارگر را نشان می‌دهد. این تنوع احتمالاً در سازگاری با میزبان لوبیا، جذب آهن و بیماری‌زایی نقش دارد. مطالعات عملکردی آینده (حذف ژن، متابولومیک، آزمون بیماری‌زایی) برای تأیید نقش این خوشه‌ها در تولید سم و جذب آهن ضروری است.

## نتیجه‌گیری

در این پژوهش برای اولین بار ۱۴ ژن NRPS در ژنوم قارچ بیماری‌زای *C. lindemuthianum* شناسایی و ساختار دامانه‌ای آن‌ها به‌طور کامل بررسی شد. نتایج نشان داد که این گونه دارای تنوع بالایی در تعداد و ساختار ژن‌های NRPS است که شامل ۶ ژن تک‌پودمانی و ۸ ژن چندپودمانی می‌شود. حضور دامانه‌های غیرمعمول PP و اپیمریزاسیون به‌عنوان دامانه انتهایی در برخی NRPS‌های چندپودمانی، سازوکارهای جایگزین برای آزادسازی پپتید نهایی را پیشنهاد می‌کند که احتمالاً در سازگاری‌های تکاملی این بیمارگر نقش دارند.

شناسایی دو خوشه ژنی شبه‌آپیسیدین NRPS1 و NRPS4 با وجود فقدان ژن‌های کلیدی مانند متیل‌ترانسفراز، آمینوترانسفراز و اسیدچرب‌سنتاز، بیانگر مسیرهای بیوسنتزی ناقص یا جایگزین برای تولید ترکیبات شبه‌آپیسیدین

## References

- Albarouki, E., Schafferer, L., Ye, F., von Wirén, N., Haas, H., & Deising, H. B. (2014). Biotrophy-specific downregulation of siderophore biosynthesis in *Colletotrichum graminicola* is required for modulation of immune responses of maize. *Molecular Microbiology*, 92(2), 338-355. [Link]
- Bachmann, B. O., & Ravel, J. (2009). In silico prediction of microbial secondary metabolic pathways from DNA sequence data. *Methods Enzymology*, 458, 181-217. [Link]
- Bills, G. F., & Gloer, J. B. (2016). Biologically active secondary metabolites from the fungi. *Microbiology Spectrum*, 4(6). [Link]
- Blin, K., Shaw, S., Augustijn, H. E., Reitz, Z. L., Biermann, F., Alanjary, M., Fetter, A., Terlouw, B. R., Metcalf, W. W., Helfrich, E. J. N., van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2023). antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic Acids Research*, 51, 46-50. [Link]

- Caza, M., & Kronstad, J. W. (2013). Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 80. [Link]
- Chen, L. H., Lin, C. H., & Chung, K. R. (2013). A nonribosomal peptide synthetase mediates siderophore production and virulence in the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*. *Molecular Plant Pathology*, 14(5), 497-505. [Link]
- Cramer Jr, R. A., Stajich, J. E., Yamanaka, Y., Dietrich, F. S., Steinbach, W. J., & Perfect, J. R. (2006). Phylogenomic analysis of non-ribosomal peptide synthetases in the genus *Aspergillus*. *Gene*, 383, 24-32. [Link]
- Darkin-Rattray, S. J., Gurnett, A. M., Myers, R. W., Dulski, P. M., Crumley, T. M., Allocco, J. J., Cannova, C., Meinke, P. T., Colletti, S. L., & Bednarek, M. A. (1996). Apicidin: a novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(23), 13143-13147. [Link]
- Gibson, D. M., Donzelli, B. G., Krasnoff, S. B., & Keyhani, N. O. (2014). Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. *Natural Product Reports*, 31(10), 1287-1305. [Link]
- Greenshields, D. L., Liu, G., Feng, J., Selvaraj, G., & Wei, Y. (2007). The siderophore biosynthetic gene SID1, but not the ferroxidase gene FET3, is required for full *Fusarium graminearum* virulence. *Molecular Plant Pathology*, 8(4), 411-421. [Link]
- Haas, H., Eisendle, M., & Turgeon, B. G. (2008). Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), 149-187. [Link]
- Hoffmeister, D., & Keller, N. P. (2007). Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural Product Reports*, 24(2), 393-416. [Link]
- Jaswal, R., Kiran, K., Rajarammohan, S., Dubey, H., Singh, P. K., Sharma, Y., Deshmukh, R., Sonah, H., Gupta, N., & Sharma, T. (2020). Effector biology of biotrophic plant fungal pathogens: current advances and future prospects. *Microbiological Research*, 241, 126567. [Link]
- Jayawardena, R., Bhunjun, C., Hyde, K., Gentekaki, E., & Itthayakorn, P. (2021). *Colletotrichum*: lifestyles, biology, morpho-species, species complexes and accepted species. *Mycosphere*, 12, 519-669. [Link]
- Keller, N. P. (2019). Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 167-180. [Link]
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874. [Link]
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Fong, J. H., Geer, L. Y., Geer, R. C., & Gonzales, N. R. (2010). CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research*, 39, 225-229. [Link]
- Milgroom, M., & Fry, W. E. (1997). Contributions of population genetics to plant disease epidemiology and management. *Advances in Botanical Research*. In (Vol. 24, pp. 1-30). [Link]
- Mukherjee, P. K., Hurley, J. F., Taylor, J. T., Puckhaber, L., Lehner, S., Druzhinina, I., Schumacher, R., & Kenerley, C. M. (2018). Ferricrocin, the intracellular siderophore of *Trichoderma virens*, is involved in growth, conidiation, gliotoxin biosynthesis and induction of systemic resistance in maize. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 505(2), 606-611. [Link]
- Pastor-Corrales, M. (2004). Review of coevolution studies between pathogens and their common bean hosts: implication for the development of disease-resistant beans. *Bean Improvement Cooperative Annual Report*, 47, 67-68.
- Rao, S., & Nandineni, M. R. (2017). Genome sequencing and comparative genomics reveal a repertoire of putative pathogenicity genes in chilli anthracnose fungus *Colletotrichum truncatum*. *PLoS one*, 12(8), e0183567. [Link]
- Rausch, C., Hoof, I., Weber, T., Wohlleben, W., & Huson, D. H. (2007). Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 78. [Link]
- Sayari, M., Sharifi-Tehrani, M., Shabani, L., Dolatabadian, A., & Daayf, F. (2025). Revealing diversity in NRPS gene clusters across six pathogenic *Colletotrichum* species. *Current Microbiology*, 82(11), 1-17. [Link]
- Sayari, M., van Der Nest, M. A., Steenkamp, E. T., Soal, N. C., Wilken, P. M., & Wingfield, B. D. (2019). Distribution and evolution of nonribosomal peptide synthetase gene clusters in the Ceratocystidaceae. *Genes*, 10(5), 328. [Link]
- Schmitt, I., & Lumbsch, H. T. (2009). Ancient horizontal gene transfer from bacteria enhances biosynthetic capabilities of fungi. *PLoS one*, 4, e4437. [Link]
- Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Sabiha, Y., Loss, O., Eisendle, M., Wallner, A., Arst Jr, H. N., Haynes, K., & Haas, H. (2007). Distinct roles for intra- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. *PLoS Pathogens*, 3(9), e128. [Link]
- Walsh, C. T., O'Brien, R. V., & Khosla, C. (2013). Nonproteinogenic amino acid building blocks for nonribosomal peptide and hybrid polyketide scaffolds. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(28), 7098-7124. [Link]
- Walton, J. D. (2006). HC-toxin. *Phytochemistry*, 67(14), 1406-1413. [Link]
- Wei, B., Ying, T. T., Lv, H. W., Zhou, Z. Y., Cai, H., Hu, G. A., Liang, H. M., Yu, W. C., Yu, Y. L., & Fan, A. L. (2025). Global analysis of fungal biosynthetic gene clusters reveals the diversification of diketopiperazine biosynthesis. *Bioresource Technology*, 422, 132218. [Link]
- Witte, T. E., Harris, L. J., Nguyen, H. D., Hermans, A., Johnston, A., Sproule, A., Dettman, J. R., Boddy, C. N., & Overy, D. P. (2021). Apicidin biosynthesis is linked to accessory chromosomes in *Fusarium poae* isolates. *BMC Genomics*, 22(1), 591. [Link]
- Zhang, S., Shi, G., Xu, X., Guo, X., Li, S., Li, Z., Wu, Q., & Yin, W. B. (2024). Global analysis of natural products biosynthetic diversity encoded in fungal genomes. *Journal of Fungi*, 10(9), 653. [Link]

جدول ۱. مقایسه‌ی اندازه و توالی دامانه‌ای پروتئین‌های NRPS تک‌پودمانی *Colletotrichum lindemuthianum* با بالاترین برخورد حاصل از بلاست پروتئین در پایگاه داده‌ی NCBI

**Table 1. Comparison of the size and domain sequence of single-modular NRPS proteins of *Colletotrichum lindemuthianum* with the top hit obtained from BLASTp in the NCBI database**

<i>C. lindemuthianum</i> NRPS used as query	Size (bp)	Domain Organization	Information regarding the top BLASTp hit			
			Accession no.	Name	Size (aa)	Domain organization
MASPO2000069NRPS6	1934	A-PP-C-PP	XP_028492282	<i>Verticillium nonalfalfae</i>	1932	A-PP-C-PP
MASPO2000237NRPS9	1279	A-PP-E	RBQ70675	<i>Verticillium dahliae</i>	1284	A-PP-E
MASPO2000455NRPS13	1022	A	XP_028490747	<i>Verticillium nonalfalfae</i>	1029	A
MASPO2000718NRPS14	1315	A	RXG43844	<i>Verticillium dahliae</i>	1060	A
MASPO2000025NRPS10	1152	A-PP-E	PMD22619	<i>Hyaloscypha hepaticicola</i>	1161	A-PP-E
MASPO2000233NRPS11	961	A-PP-Te	XP_045941831	<i>Aspergillus melleus</i>	948	A-PP-Te

جدول ۲. مقایسه‌ی اندازه و توالی دامانه‌ای پروتئین‌های NRPS چندپودمانی *Colletotrichum lindemuthianum* با بالاترین برخورد حاصل از بلاست پروتئین در پایگاه داده‌ی NCBI

**Table 2. Comparison of the size and domain sequence of multi-modular NRPS proteins of *Colletotrichum lindemuthianum* with the top hit obtained from BLASTp in the NCBI database**

<i>C. lindemuthianum</i> NRPS used as query	Size (bp)	Domain Organization	Information regarding the top BLASTp hit			
			Accession no.	Name	Size (aa)	Domain organization
MASPO2000566NRPS3	3223	PP-C-A-PP-C-C-A-PP	XP_043019359	<i>Diaporthe citri</i>	3249	PP-C-A-PP-C-C-A-PP
MASPO2000157NRPS2	2406	A-PP-C-A-E	KAH8893464	<i>Thozetella</i> sp. PMI_491	2421	A-PP-C-A-E
MASPO2000860NRPS12	2791	PP-C-C-A-PP-C	XP_028466097	<i>Sodiomyces alkalinus</i>	2813	PP-C-C-A-PP-C
MASPO2000662NRPS7	2455	A-PP-C-A-PP-C	POS71211	<i>Diaporthe helianthi</i>	2460	A-PP-C-A-PP
MASPO2000438NRPS4	2487	A-PP-C-A-PP	KAH8886122	<i>Thozetella</i> sp. PMI_491	2518	A-PP-C-A-PP
MASPO2000528NRPS8	4915	A-C-A-PP-C-PP-C-A-C-PP-C-PP	CRK43302	<i>Verticillium longisporum</i>	5149	A-PP-C-A-PP-C-PP-C-A-PP-C-PP-C-PP-C
MASPO2000320NRPS1	4935	A-PP-C-C-A-PP-C-A-PP-C-A-PP	KAF4976734	<i>Fusarium zealandicum</i>	5113	A-PP-C-C-A-PP-C-A-PP-C-A-PP
MASPO2000438NRPS5	2112	PP-C-A-PP-C	MCJ1247511	<i>Trapelia coarctata</i>	1693	PP-C-A-PP-C