

شناسایی همولوگ ژن *Fol-SIX1* در ژنوم *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*

Identification of the *Fol-SIX1* gene homolog in the genome of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*

فرهاد شکوهی فر^{۱*}، الهه ربیعی مطلق^۱

۱- به ترتیب استادیار، دانشجوی دکتری، دانشگاه فردوسی مشهد

Shokouhifar F^{*1}, Rabiei-Motlagh E¹

1. Assistant Professor, PhD Student, Ferdowsi University of Mashhad

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Shokouhifar@um.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵)

چکیده

در طی فرآیند بیماری‌زایی، عامل *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) پروتئین اثرگذاری به نام SIX1 را درون آوند گیاه گوجه‌فرنگی ترشح می‌کند. در ارقام مقاوم گوجه‌فرنگی که حامل ژن مقاومتی I-3 هستند، پروتئین اثرگذار SIX1 نقش یک فاکتور غیربیماری‌زایی را ایفا می‌کند. همولوگ ژن SIX1 از برخی فرم‌های تخصصی دیگر *F. oxysporum* گزارش شده‌است. تاکنون حضور این ژن در فرم اختصاصی *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom) تایید نشده‌است. این بیمارگر از مهمترین عوامل کاهش عملکرد، در ارقام ملون در سراسر جهان از جمله ایران و به خصوص استان خراسان است. شناسایی ژن‌های اثرگذار در Fom می‌تواند تولید ارقام مقاوم به این بیماری را تسهیل کند. در مطالعه حاضر ابتدا از روش‌های بیوانفورماتیکی برای شناسایی همولوگ ژن اثرگذار SIX1 در ژنوم Fom استفاده شد. توالی پروتئین Fol-SIX1 در پایگاه داده WGSFOM با استفاده از ابزار tBLASTN و با حد 0.1 e-value جستجو شد. چهار توالی به هم پیوسته (کانتیک) شناسایی شد که فقط یکی از آن‌ها هم‌پوشانی و شباهت قابل قبولی را با Fol-SIX1 دارا بود. توالی به هم پیوسته موردنظر بازبایی و ORF‌های ممکن با نرم‌افزار VectorNTi پیش‌بینی شد. نتایج نشان داد که توالی ORF ژن مفروض بر روی رشته آنتی‌سنس قرار داشته و پروتئینی به طول ۲۸۳ اسید آمینه را کد می‌کند و بیشترین شباهت را با پروتئین Fol-SIX1 دارد. پیش‌بینی ساختار ژنی مفروض با FGENESH+ صورت گرفت. در ادامه ژن فوق در دو نژاد Fom، توسط یک جفت آغازگر اختصاصی داخلی ردیابی شد. سپس طول کامل ژن با یک جفت آغازگر خارجی توالی‌یابی و توالی آن با توالی‌های همولوگ خود مقایسه شد. در این مطالعه برای نخستین بار همولوگ پروتئین اثرگذار Fol-SIX1 در ژنوم Fom شناسایی و Fol-SIX1 نامیده شد. مطالعه پروتئین Fom-SIX1 جدید نشان داد که ژن مفروض Fom-SIX1 قابلیت کد کردن یک پروتئین کوچک ترشحی غنی از سیستئین و پایدار در محیط خارج سلولی را داراست که فاقد دامین شناسایی شده بوده و با خصوصیات ذکر شده برای پروتئین‌های اثرگذار کاملاً منطبق است.

واژه‌های کلیدی

همولوگ

Fol-SIX1

Fusarium oxysporum f.
sp. *Melonis*

پروتئین ترشحی

مقدمه

برهمکنش گیاهان و عوامل بیماری‌زا در طی تکامل سبب توسعه سیستم‌های مقاومتی و بیماری‌زایی مختلفی به‌ترتیب در گیاه و بیمارگر شده‌است. هرچند گیاهان از موانع غیرالقایی متعددی مانند سدهای فیزیکی و شیمیایی مختلف جهت مقاومت در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها بهره می‌گیرند ولی در سیستم مقاومت القایی به طور فعال نسبت به عوامل بیمارگر واکنش نشان می‌دهند. مدل‌های مختلفی تاکنون جهت بیان این الگوی تکاملی ارائه شده‌است (Agrawal and Lively 2002; Jones and Dangl 2006; Sacristan and Garcia-Arenal 2008). براساس مدل ارائه شده توسط Jones and Dangl (2006) عوامل بیماری‌زا قادرند با مواد مولکولی ترشحی خود روی گیاهان اثر گذاشته و در صورت مساعد بودن شرایط سبب بروز بیماری در گیاه شوند. در مقابل گیاهان قادرند با شناسایی الگوی مولکولی مرتبط به بیمارگر (PAMPs¹) سیستم دفاعی مناسبی را جهت بروز مقاومت در خود فعال کنند. این نوع مقاومت را مقاومت القا شده توسط الگوی مولکولی مرتبط با بیمارگر (PTI²) می‌نامند. بیمارگر در مسیر تکامل خود توسط عوامل اثرگذار در بیماری‌زایی سیستم مقاومتی گیاه را مهار یا مختل کرده و سبب بروز بیماری می‌شود که آن را حساسیت ناشی از عوامل اثرگذار³ (ETS) می‌نامند. در مقابل گیاهان توانسته‌اند با شناسایی این عوامل اثرگذار، سیستم دفاعی خود را فعال کنند که به این مقاومت القا شده ناشی از عوامل اثرگذار⁴ (ETI) گفته می‌شود. در این حالت پروتئین اثرگذار شناسایی شده به‌عنوان "فاکتور غیر بیماری‌زایی" یا Avr⁵ فعالیت کند. در روند تکامل، بیمارگر با حذف و یا تغییر در پروتئین اثرگذار سیستم دفاعی گیاه را مهار کرده و سبب بروز نژاد جدید در جمعیت خود می‌شود (Jones and Dangl 2006). به این ترتیب در طی روند تکامل در جمعیت بیمارگر نژادهای مختلف و در پی آن در جمعیت میزبان ارقام مقاوم ایجاد می‌شود. لذا شناسایی این ژن‌های اثرگذار در جمعیت بیمارگر جهت شناسایی مسیرهای

دفاعی گیاه و در نهایت تولید ارقام مقاوم بسیار حائز اهمیت است (Vleeshouwer and Oliver 2014) و به همین دلیل جستجو برای یافتن این ژن‌های اثرگذار در مطالعات متعددی مورد توجه قرار گرفته‌است (Luderer et al. 2002; Dodds et al. 2004; Marshall et al. 2011; Brefort et al. 2014).

بیماری زردی و پژمردگی آوندی ناشی از *F. oxysporum* f. sp. melonis (Fom) از بیماری‌های مهم ارقام مختلف *Cucumi smelo* می‌باشد. در روش‌های کلاسیک بر اساس الگوی بیماری‌زایی قارچ روی گیاهان مقاوم چهار نژاد در جمعیت بیمارگر شناسایی شده‌است (Banihashemi 2010). از سوی دیگر به کمک روش‌های توارث صفات و تهیه نقشه‌های پیوستگی، دو ژن مقاومتی *Fom1* و *Fom2* در ارقام مقاوم خربزه شناسایی شده که در این بین ژن *Fom2* کلون شده است (Wang et al. 2000; Luo et al. 2001). لذا براساس نظریه ژن برای ژن فلور، باتوجه به وجود نژادهای مختلف در جمعیت بیمارگر و وجود ژن‌های مقاومتی در میزبان، احتمال وجود ژن‌های اثرگذار در جمعیت بیمارگر (*Fom*) *F. oxysporum* f. sp. melonis منطقی به‌نظر می‌رسد.

مطالعات انجام‌شده روی فرم اختصاصی *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) به شناسایی تعدادی از ژن‌های اثرگذار منتج شده که پروتئین‌های ترشحی به‌نام SIX⁶ را کد می‌کنند به طوری که در بافت آوندی گیاه ترشح شده و در توسعه قارچ در گیاه تاثیرگذار هستند. یکی از روش‌های شناسایی ژن‌های اثرگذار در قارچ، جستجوی برای یافتن توالی‌های مشابه با ژن‌های اثرگذار شناخته شده‌است (Thatcher et al. 2012). با استفاده از این روش تاکنون همولوگ تعدادی از این ژن‌های اثرگذار از جمله *FOL-SIX6* و *FOL-SIX7* در سایر فرم‌های تخصصی *F. oxysporum* گزارش شده‌است (Vander Does et al. 2008). لذا این انتظار وجود دارد که همولوگ برخی از ژن‌های *Avr* شناسایی شده در *Fol*، در نژادهای فرم اختصاصی *Fom* نیز وجود داشته‌باشد.

در میان ژن‌های اثرگذار شناسایی شده در قارچ *Fol* ژن *Fol-SIX1* به دلیل قابل شناسایی بودن توسط سیستم دفاعی گیاه در بعضی از ارقام مقاوم نقش غیر بیماری‌زایی (*Avr3*) دارد. این ژن پروتئینی

¹ Pathogen-associated molecular patterns² PAMP-triggered immunity (PTI)³ Effector triggered susceptibility (ETS)⁴ Effector triggered immunity (ETI)⁵ Avirulence factor⁶ Secreted in xylem (SIX)

به طول ۲۸۴ اسیدآمینه کد کرده و در مرحله توسعه قارچ در شبکه آوندی گیاه گوجه‌فرنگی ترشح می‌شود (Rep et al. 2004). مطالعات نشان‌دهنده این پروتئین ترشچی با دارا بودن چهار باند دی سولفیدی، ساختار ثانویه پایداری در خارج از سلول داشته و حضور آن جهت بیماری‌زایی در گیاه ضروری است (Rep et al. 2004).

با توجه به نقش کلیدی این ژن در بیماری‌زایی قارچ روی گیاه جستجو در فرم‌های اختصاصی دیگر از جمله فرم اختصاصی *F. oxysporum f. sp. conglutinans* (Foc) منجر به شناسایی همولوگ آن شده و نقش آن در برهمکنش میان این فرم اختصاصی و گیاه آرابیدوپسیس مورد بررسی قرار گرفته‌است (Thatcher et al. 2012). یافتن توالی مشابه ژن‌های اثرگذار می‌تواند در درک بهتر برهمکنش فرم اختصاصی *F. oxysporum f. sp. melonis* و گیاه ملون نیز بسیار مؤثر باشد.

تجزیه توالی همولوگ ژن *Fol-SIX1* توالی‌هایی از ژنوم *F. oxysporum f. sp. melonis* انتخاب می‌شود که با امتیاز هم‌ردیفی مناسب در tBLASTn با پروتئین Fol-SIX1 (CAE55866.1) منطبق شده باشد. در پایگاه موسسه علمی براد (Broad 2007) حدود ۵۰۰ جفت باز از نواحی اطراف ۵' و ۳' توالی مورد نظر بازیابی شد. سپس به‌منظور شناسایی توالی کامل چارچوب‌های خواندنی ORF و مشخص کردن ساختار اگزون-اینترون ژن، این توالی به‌کمک برنامه FGENESH+ (Solovyev et al. 2006) تجزیه شد. به‌منظور تایید حضور ژن در منطقه شناسایی شده، ORF ممکن در توالی شناسایی‌شده با نرم افزار Vector NTi تجزیه شد. جهت اطمینان بیشتر از صحت نتایج به‌دست‌آمده، موقعیت ژن مفروض بر روی نقشه ژنومی *F. oxysporum f. sp. melonis* در پایگاه موسسه علمی براد بررسی شد.

پیشرفت‌های صورت‌گرفته در علم بیوانفورماتیک امکان استفاده از روش‌های مبتنی بر بیوانفورماتیک را در جستجوی همولوگ ژن‌های مختلف ممکن ساخته‌است (Sato et al. 2011). امروزه داده‌های ژنومی فرم اختصاصی Fom از طریق پایگاه بانک ژن و همچنین موسسه علمی براد (Broad 2007)^۱ در دسترس عموم قرار دارد. لذا در مطالعه حاضر، با توجه به اهمیت ژن‌های اثرگذار بیمارگر در شناسایی مسیرهای دفاعی گیاه و در نهایت تولید ارقام مقاوم و همچنین اهمیت ژن اثرگذار *Fol-SIX1*، حضور همولوگ این ژن در ژنوم فرم اختصاصی Fom با تکنیک‌های بیوانفورماتیکی و سپس آزمایشگاهی بررسی و خصوصیات پروتئین کدشونده توسط این ژن به روش *In Silico* مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

جستجوی پایگاه داده‌های ملکولی و شناسایی توالی همولوگ ژن اثرگذار *Fol-SIX1*

در این بررسی ابتدا توالی آمینواسیدی پروتئین Fol-SIX1 متعلق به *F. oxysporum f. sp. lycopersici* (Fol) با شماره بازیابی CAE55866.1 از بانک ژنومی NCBI بازیابی شد. از این توالی به‌منظور جستجوی توالی‌های همولوگ این ژن در ژنوم *F.*

جدایه‌های قارچی دو جدایه *F. oxysporum f. sp. melonis* به نام‌های Fom-R1 و Fom-R1.2 (به ترتیب متعلق به نژادهای ۱ و ۱/۲ بیمارگر) و یک جدایه *F. oxysporum f. sp. lycopersici* به نام Fol021 از گروه گیاهپزشکی دانشگاه شیراز تهیه شد. جدایه‌ها در ابتدا بر روی محیط سیب‌زمینی- دکستروز- آگار (PDA) کشت و سپس به-منظور حفظ توان بیماری‌زایی آن‌ها در طول انجام پروژه، بر روی محیط‌های SNA شیب‌دار، خاک و آب- آگار منتقل شدند.

استخراج DNA

ابتدا از هر جدایه، کشت مایعی بر روی محیط مایع سیب‌زمینی- دکستروز (PDB) تهیه شد. سپس استخراج DNA با استفاده از QiagenDNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Co., Germany) انجام شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از

¹ Broad institute

الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد محتوی ۰/۰۱ درصد رنگ DNA Green Viewer بررسی شد.

ردیابی و تکثیر طول کامل ژن اثرگذار *Fom-SIX1* در ژنوم جدایه‌های *F. oxysporum* f. sp. *melonis*

در ابتدا جهت ردیابی ژن اثرگذار *Fom-SIX1* در ژنوم دو نژاد از *F. oxysporum* f. sp. *melonis*، یک جفت آغازگر داخلی به نام PSh51-2-F/R طراحی شد (جدول ۱). برای این منظور، به کمک نرم‌افزار SeqMan (Swindell and Plasterer 1997) مناطق نسبتاً حفاظت‌شده در درون توالی ژن مفروض *Fom-SIX1* که به کمک روش‌های بیوانفورماتیکی پیش‌بینی شده بود و توالی ژن‌های *Fol-SIX11* و *Foc-SIX1*، ارایه‌شده در بانک داده‌های ژنومی NCBI با شماره دستیابی‌های AJ608703 و HQ260601، مشخص شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار Primer premier 5 یک جفت آغازگر داخلی در مناطق حفاظت‌شده طراحی و در نهایت کیفیت آغازگر طراحی شده در توالی به هم پیوسته فوق بزرگ

AGNE01001175.1 به کمک نرم‌افزار فوق ارزیابی شد. در ادامه جهت تکثیر طول کامل ژن فوق، یک جفت آغازگر با نام PSh51-1-F/R در خارج از محدوده ORF طراحی شد (جدول ۱). برای این منظور حدود ۲۰۰ جفت باز از مناطق بالادست و پایین‌دست توالی ژن مفروض *Fom-SIX1* که به کمک روش‌های بیوانفورماتیکی پیش‌بینی شده بود، از پروژه ژنومی موسسه علمی براد استحصال شد و مناطق حفاظت‌شده در خارج از محدوده ORF این ژن براساس توالی‌های بالادست و پایین‌دست ژن‌های *Fol-SIX1* و *Foc-SIX1*، ارایه شده در بانک داده‌های ژنومی NCBI با شماره دستیابی‌های AJ608703 و HQ260601، مشخص شد. موقعیت و کیفیت جفت آغازگر طراحی شده با نرم‌افزار Primer premier 5 مشابه بالا ارزیابی شد.

جهت انجام واکنش PCR مقدار ۲۰ نانوگرم از DNA ژنومی به واکنش ۱۰ میکرولیتری حاوی ۲/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میکرومول dNTPs (GeNetBio, south Korea)، یک میکرولیتر بافر PCR 10X (GeNetBio, south Korea)، پنج پیکومول از آغازگرهای رفت و برگشت (سنتز شده توسط BioNeer Co.)، یک کره‌جنوبی و یک واحد آنزیم تگ‌پلیمرز (Taq DNA Polymerase, GeNetBio, South Korea) اضافه شد. برنامه

حرارتی پس از بهینه کردن بصورت ۳ دقیقه در ۹۳ درجه سانتی-گراد و ۳۰ چرخه با ۴۵ ثانیه در ۹۲ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۵۸ دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد (برای آغازگر PSh51-2-F/R) یا ۷۲ درجه سانتی‌گراد (برای آغازگر PSh51-1-F/R)، یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله تکثیر نهایی با ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Eppendorf) انجام شد. تصویر الگوی بانندی تکثیر شده از نمونه‌ها توسط الکتروفورز محصول واکنش روی ژل آگارز یک درصد محتوی ۱۰ درصد رنگ DNA Green Viewer تهیه شد.

تکثیر توالی حامل ژن هدف با استفاده از کیت AccuPower® ProFi Taq PCR Premix (شرکت Bioneer، کره جنوبی) و آغازگرهای PSh51-1-F/R در برنامه حرارتی شامل ۴ دقیقه در ۹۳ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه با ۴۵ ثانیه در ۹۲ درجه سانتی-گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۲ درجه سانتی‌گراد و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و پنج دقیقه پایانی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf thermogradient، آلمان) انجام شد. محصول PCR با استفاده از کیت Gele extraction Kit (BioNeer Co.) از درون ژل آگارز یک درصد خالص شد. محصول تخلیص‌شده در دو جهت با آغازگرهای اختصاصی PSh51-1-F/R توسط شرکت ماکروژن کره توالی‌یابی شد. ترادف ژن *Fom-SIX1* در سطح پروتئین با استفاده از نرم‌افزارهای SeqMan (Swindell and Plasterer 1997)، Mega5 (Tamura et al. 2011) و Clustalw2.1 (Larkin et al 2007) با ترادف‌های مشابه در بانک داده‌های ژنومی NCBI مقایسه شد.

مطالعه خصوصیات پروتئین *Fom-SIX1* با روش *In Silico* پس از مشخص شدن ORF کامل ژن *Fom-SIX1*، ترجمه پروتئینی آن به کمک برنامه MEGA5 تهیه شد. در ادامه، تجزیه و تحلیل‌های بیشتر فقط بر روی توالی پروتئین انجام شد. به منظور بررسی حضور ساختارهای دمینی و خصوصیات مانند نواحی سیگنال پپتیدی و توالی‌های تکراری، این توالی پروتئینی در پایگاه SMART (Letunic et al. 2004) تجزیه شد و سپس سایت برشی سیگنال پپتید پیش‌بینی شده، در پایگاه Signal P3 شناسایی شد (Petersen et al. 2011).

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این بررسی

Code	Sequence (5'-3')	Target	Amplicon length (bp)
PSh51-1-F	CCGGATTTTGAGCTTTCGACAA	<i>SIX1</i>	987
PSh51-1-R	GAGGGCTTTGGATCGCAACTTA		
PSh51-2-F	TTGGGTCTGCGGCTTATGCTC	<i>SIX1</i>	264
PSh51-2-R	GGTCCCCTTCTTAAGGTTGACA		

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
395 bits(1015)	5e-128	Compositional matrix adjust.	193/284(68%)	217/284(76%)	6/284(2%)	-2
Query 1	MAPYSHVLLGALSILGFGAYAAVREPOIFFNLTYEYLDKVAASHG-SPPDKSDLPW	59				
Sbjct 2861	M PY HVLG L S+L G AYAAVREPOIFFNLTY E+LDKVA+ G SPPD SDLPW	2682				
Query 60	NDTHGSFPGMETDDGVQETGSSLSRRGHVNLKREPFGEESRMDRVTDMLQALHDL	119				
Sbjct 2681	+DTH SFP NETD+ VQ ETG+SLSRG +VNL+KR+P G E+ ND VT DMLQALHDL	2502				
Query 120	VERFGTGYRAVSGLCYDTRRATRKIECNKPSVRERDRSVTRACPEGQECTTFNAYNFR	179				
Sbjct 2501	V++FG G+RA SGLC +++ C KP VR C E +ECTTF A NFR	2331				
Query 180	HHQVTFPVCGRPIEVKDRHDIGIHTWQGTWYSPKSPGTIDYFAQNAAGTNGYFGYDG	239				
Sbjct 2330	FPVCG RIEV +RHDIG HTEW G WYSPKSPGTIDY FAQNAAG+LNG+F ++G	2157				
Query 240	VYSDGYKTSSHGHGHSWCINCPRGKVTITNTYRATWAFGYTSP	283				
Sbjct 2156	VYS G SS G GHSWCINCPR GK+TIT+T RATWA GTTSP	2025				

شکل ۱- نتیجه هم‌ردیفی پروتئین Fol-SIX1 با توالی به‌هم‌پیوسته AGNE01001175 مربوط به داده‌های ژنومی فرم اختصاصی *F. oxysporum* f. sp. *melonis*. نشان‌دهنده ناحیه هم‌پوشان، اسیدآمینه‌های یکسان و مشابه میان دو توالی و سطح معنی‌داری هم‌ردیفی دو توالی می‌باشد.

شناسایی شده کاملاً یکسان بود و ۲۱۷ اسیدآمینه از نظر ساختاری مشابه بودند (شکل ۱).

نتایج بررسی اولیه، حضور توالی مشابه با پروتئین Fol-SIX1 را در رشته آنتی‌سنس از ناحیه ۲۸۶۱:۲۰۲۵ مربوط به توالی به‌هم‌پیوسته AGNE01001175 از ژنوم *Fom* با احتمال بسیار معنی‌داری تایید کرد. هرچند در زمان انجام این مطالعه همولوگ ژن *Fol-SIX1* در فرم‌های اختصاصی دیگر قارچ *F. oxysporum* گزارش نشده بود، با این حال به‌منظور مشاهده موقعیت توالی شناسایی شده و اطلاعات مستندسازی شده موجود در خصوص این ناحیه، منطقه مذکور با استفاده از نرم‌افزار مرورگر ژنوم، موجود در مرکز تحقیقات براد، مورد بررسی قرار گرفت. از آن‌جا که در زمان انجام این مطالعه هیچ‌گونه اطلاعات مستند شده‌ای^۱ در خصوص ناحیه شناسایی شده در پایگاه بانک ژن وجود نداشت، احتمال حضور ژن در توالی مورد نظر از جنبه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

به‌منظور تایید حضور ژن در ناحیه شناسایی شده، چارچوب‌های خواندنی ممکن در توالی شناسایی شده مورد بررسی قرار گرفت.

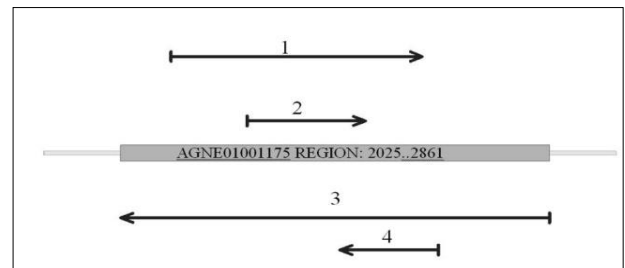
توالی سیگنال پپتید از محل سایت برش حذف و تعداد و موقعیت اسیدآمینه سیستمین و باندهای دی‌سولفیدی در باقی‌مانده توالی به کمک نرم‌افزار DiANNA 1.1 (Ferre and Clote 2005) پیش‌بینی شد. جهت مقایسه پروتئین Fom-SIX1 با پروتئین Fol-SIX1 ساختار ثانویه دو پروتئین به وسیله برنامه PSIPred (Buchan et al. 2013) مطالعه و مقایسه شد.

نتایج و بحث

باتوجه به در دسترس بودن توالی ژنوم فرم اختصاصی *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom) از طریق NCBI و همچنین موسسه علمی براد، جستجوی توالی مشابه پروتئین اثرگذار Fol-SIX1 انجام شد. نتایج جستجو با استفاده از ابزار tBLASTn به‌شناسایی چهار ناحیه مشابه در داده‌های ژنومی *Fom* با سطح معنی‌داری بین صفر تا ۷/۳ منتج شد. در این بین، بخشی از توالی به‌هم‌پیوسته (Contig) با شماره بازیابی AGNE01001175.1 با ۳۹۵ امتیاز و در سطح معنی‌داری (e-value) 5E-128، با ۹۹ درصد از طول پروتئین Fol-SIX1 هم‌پوشانی نشان‌داد. از ۲۸۴ اسیدآمینه این پروتئین، ۱۹۳ اسیدآمینه با ناحیه چارچوب خواندنی رشته آنتی‌سنس در منطقه ۲۸۶۱:۲۰۲۵ از توالی به‌هم‌پیوسته

¹Annotated

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
395 bits(1015)	5e-128	Compositional matrix adjust.	193/284(68%)	217/284(76%)	6/284(2%)	-2
Query 1	HVPYGHVLLGLSVLGSAAATQAQAAVREPQIFFNLTYAEHLDKVAAASGRSPDNDLPW					60
Sbjct 1	H FY NVLLG LS+LG ATAQAAVREPQIFFNLTY E+LDKVAAG SPPD SLPW					59
Query 61	DDTHSSFPWNETDMDVQAETGNSLSRRGRVVMKRDPPVGHETLMDHVTMDMLQALHDL					120
Sbjct 60	+DTH SFP NETD+ VQ ETG+SLSRG +VNL+KR+P G E+ MD VT DMLQALHDL					119
Query 121	VQKFGAGHRATSGLCGLK---LKRVSCKGPDVRGTGKAMAPCGEHECTTFAVNFRRL					177
Sbjct 120	V+FG G+RA SGLC +++ C KP VR C E +ECTTF A NFR					179
Query 178	AAK--FPVCGARIEVTERHDIRHTEUDGVVPESPKSPGTYSFAQNAAGSLNGFFDFNG					235
Sbjct 180	+ FVCG RIEV +RHDIG HTEW G WYPESPKSPGTYS FAQNAAG+LNG+F ++G					239
Query 236	VYSSGEHSSRGNHGSUSCINCPGGKLTITSTNRATWAGTSP					279
Sbjct 240	VYS G SS G GHSUSCINCP GK+TIT+T RATWA GTTSP					283



شکل ۳- نتیجه هم‌ردیفی پروتئین Fol-SIX1 با پروتئین کدشونده توسط چارچوب خواندنی ۲۸۳ کدونی در رشته آنتی‌سنس فرم اختصاصی *F. oxysporum* f. sp. *melonis* نشان‌دهنده انطباق دو توالی و عدم وجود توالی اینترونی در چارچوب‌خواندنی این ژن می‌باشد.

شکل ۲- چارچوب‌های خواندنی شناسایی‌شده در منطقه 2025:2861 مربوط به توالی به‌هم‌پیوسته AGNE01001175 از ژنوم *F. oxysporum* f. sp. *melonis* -۱. به ترتیب عبارتند از چارچوب‌های خواندنی حامل ۱۶۶، ۷۸، ۲۸۳ و ۶۵ کدون قرارگرفته روی رشته‌های سنس و آنتی‌سنس با استفاده از نرم افزار Vector NTi V.11.

دست آن با استفاده از برنامه تحت شبکه FGENESH+ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج وجود یک توالی کدکننده را در ناحیه مورد نظر تایید کرد که با چارچوب خواندنی شماره ۳ در شکل ۲ انطباق داشت. همچنین جایگاه شروع نسخه‌برداری در فاصله ۲۶۴ جفت باز در بالا دست کدون آغاز و توالی Poly A با فاصله ۳۰ نوکلئوتید در پایین دست کدون خاتمه شناسایی شد.

نتایج تجزیه توالی کامل به‌هم‌پیوسته AGNE01001175 در نرم‌افزار Vector NTi نشان‌داد که در محدوده ۲۸۶۱:۲۰۲۵ دو چارچوب در رشته سنس با ۷۸ و ۱۶۶ کدون و دو چارچوب دیگر در رشته آنتی‌سنس با ۲۸۳ و ۶۵ کدون حضور دارد (شکل ۲).

در نهایت به‌منظور تایید نتایج حاصل، موقعیت این ژن بر روی نقشه ژنومی *Fom* تهیه‌شده توسط پایگاه موسسه علمی براد مورد بررسی قرارگرفت. نتایج بدست‌آمده صحت نتایج قبلی را تایید کرد و نشان‌داد که همولوگ ژن *Fol-SIX1* در ژنوم *Fom* بر روی توالی به‌هم‌پیوسته فوق‌بزرگ (Supercontig) شماره ۵۰۰ و در محدوده ۲۰۱۰ تا ۲۸۶۱ جفت باز و بر روی رشته آنتی‌سنس قرار گرفته‌است. در این بررسی هیچ توالی EST شناخته‌شده‌ای در بالادست ژن مفروض شناسایی نشد. همچنین نتایج بدست آمده هم‌پوشانی طول کامل دو همولوگ با ۸۷ درصد شباهت نوکلئوتیدی را نشان داد.

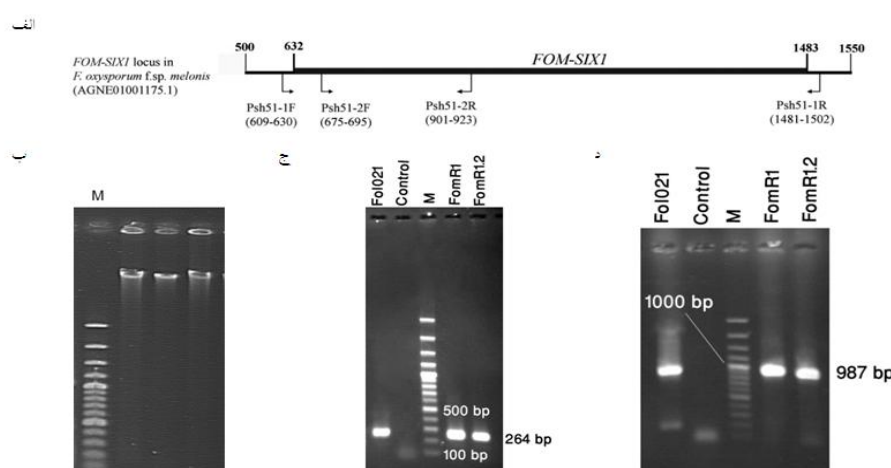
مقایسه نتایج به دست‌آمده با نتایج هم‌ردیفی نشان‌داد که چارچوب‌خواندنی حامل ۲۸۳ کدون قرارگرفته در رشته آنتی‌سنس (چارچوب شماره ۳) با توالی پروتئین اثرگذار *Fol-SIX1* انطباق دارد. هم‌ردیفی جفتی پروتئین کدشونده توسط این چارچوب‌خواندنی با پروتئین *Fol-SIX1* این انطباق را تایید کرد (شکل ۳). نتایج نشان داد ژن احتمالی شناسایی شده قادر است پروتئینی را کد کند که یک اسیدآمینو کمتر از پروتئین *Fol-SIX1* داشته ولی ۱۹۳ اسیدآمینو آن‌ها یکسان است. پیوستگی ناحیه هم‌پوشان پروتئین *Fol-SIX1* با توالی ژنومی شناسایی‌شده نشان دهنده عدم حضور توالی اینترونی در این ژن بود. سه ناحیه مشابه دیگر به دلیل سطوح معنی‌داری پایین (۳/۵، ۴/۳ و ۷/۳) و همچنین هم‌پوشانی کم با پروتئین *Fol-SIX1* مورد توجه قرار نگرفتند (داده‌ها ارایه نشده).

در مطالعات قبلی پژوهشگران به‌کمک آغازگرهای اختصاصی ژن *Fol-SIX1* نتوانستند همولوگ این ژن را در ژنوم *Fom* ردیابی کنند (Vander Does et al. 2008; Lievens et al. 2009). جستجوی مقایسه‌ای ژن، ابزار توانمندی را برای شناسایی همولوگ یک ژن در موجودات وابسته فراهم کرده‌اند.

وجود توالی‌های تنظیمی در بالادست ژن شناسایی شده، می‌تواند احتمال صحت واقعی بودن آن را افزایش دهد. لذا ناحیه ژنومی شناسایی‌شده به انضمام حدود ۵۰۰ جفت باز بالا دست و پایین

جدول ۲- درصد تشابه، همسانی و هم‌پوشانی توالی آمینواسیدی *Fom-SIX1* با دو پروتئین *Fol-SIX1* و *FO5176-SIX1*

	Gene bank accession	Query cover %	% aa identity	% aa similarity
FOL-SIX1	CAE55866.1	98	68	76
FO5176-SIX1	AEN94577.1	100	67	77



شکل ۴- الف) نمای شماتیک توالی ژن *Fom-SIX1* (مستطیل خاکستری). محل قرار گرفتن آغازگرهای طراحی شده با فلش نمایش داده شده است، ب) نتیجه استخراج DNA از میسلیم جدایه‌های قارچی؛ ج) ردیابی ژن اثرگذار *SIX1* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PSh51-2F/R؛ د) الگوی بانندی حاصل از محصول PCR اثرگذار *SIX1* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PSh51-1F/R. جدایه‌های مورد بررسی عبارتند از: Fom-R1: *F. oxysporum* f. sp. melonis race1, Fom-R1.2: *F. oxysporum* f. sp. melonis race1.2, Fol021: *F. oxysporum* f. sp. Lycopersici. نشان M با علامت اختصاری 1 Kb DNA ladder نشان داده شده است.

توالی این سه ژن با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 به شناسایی نواحی حفاظت شده میان آن‌ها منجر شد. در ناحیه مذکور یک جفت آغازگر داخلی به نام PSh51-F2/R2 جهت ردیابی ژن *Six1* طراحی شد (شکل ۴- الف و جدول ۱). ارزیابی جفت آغازگر فوق در توالی به هم پیوسته فوق بزرگ AGNE01001175.1 اختصاصیت بالای این آغازگرها را در ایجاد تک باند اختصاصی در ژنوم *Fom* نشان داد. براساس توالی ژن *SIX1* در دو فرم اختصاصی *Fol* و *Foc* و توالی همولوگ *Fom-SIX1* که در مطالعه حاضر به کمک روش‌های بیوانفورماتیکی پیش‌بینی شده بود، طول قطعه قابل تکثیر از توالی DNA ژنومی با این آغازگرهای اختصاصی ۲۶۴ جفت باز بود (شکل ۴- الف). استخراج DNA از بافت میسلیم رشد یافته در محیط کشت مایع انجام شد. کیفیت و غلظت آن با الکتروفورز در مقایسه با نشانگر وزنی در حدود ۲۵ تا ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر تخمین زده شد (شکل ۴- ب). در الگوی الکتروفورزی محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PSh51-2-F/R، تک بانندی در محدوده

در مطالعه حاضر با جستجوی توالی ژنوم *Fom* توسط توالی پروتئینی *Fol-SIX1*، برای نخستین بار همولوگ این ژن در فرم اختصاصی *Fom* ردیابی شد. در این بررسی جهت نام‌گذاری همولوگ شناسایی شده از سیستم نام‌گذاری پیشنهاد شده در مقالات استفاده شد (Thatcher et al. 2012). در این سیستم همولوگ ژن‌های اثرگذاری *SIX* به صورت زیر نام‌گذاری می‌شوند: {FO} [f.sp] [strain code] [Six#]

در صورت نامشخص بودن و یا تفاوت بین فرم‌های اختصاصی، همولوگ شناسایی شده به نام *Fom-SIX1* نام‌گذاری شد.

پس از شناسایی ژن اثرگذار *Fom-SIX1* با روش‌های بیوانفورماتیکی، حضور این ژن در ژنوم دو نژاد ۱ و ۱/۲ از فرم اختصاصی *F. oxysporum* f. sp. melonis با روش PCR با آغازگرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور آغازگرهای اختصاصی جهت ردیابی و تکثیر توالی کامل ژن *Fom-SIX1* بر اساس تجزیه توالی ژن‌های *Fom-SIX1*؛ *Fol-SIX1* (AJ608703) و *Foc-SIX1* (HQ260601) طراحی شد. هم‌ردیفی

۲۰۰ تا ۳۰۰ جفت باز نشانگر وزنی در هر سه نمونه مشاهده شد (شکل ۴-ج) که با اندازه مورد انتظار ۲۶۴ جفت‌باز انطباق داشت (شکل ۴-ج). نتایج فوق حضور یک نسخه از ژن اثرگذار *Fom-SIX1* در ژنوم هر دو نژاد *Fom* را تایید کرد.

در مطالعات قبلی، آغازگرهای طراحی شده قادر به ردیابی ژن اثرگذار *SIX1* در ژنوم *Fom* نبودند (Vander Does et al. 2008; Lievens et al. 2009). براساس نتایج به دست آمده جفت آغازگر PSh51-2-F/R که در نواحی نسبتاً حفاظت‌شده ژن *SIX1* طراحی شده، قادر به ردیابی این ژن در هردو فرم اختصاصی گوجه‌فرنگی و ملون می‌باشد.

پس از تایید حضور ژن اثرگذاری *Fom SIX1* در درون ژنوم دو نژاد از فرم اختصاصی *Fom*، اقدام به تکثیر توالی کامل ژن مذکور با روش PCR شد. برای این منظور، یک جفت آغازگر به نام PSh51-F1/R1 در نواحی حفاظت‌شده خارج از ORF مربوط به *SIX1* طراحی شد (شکل ۴-الف). براساس تجزیه‌های صورت گرفته طول قطعه قابل تکثیر از توالی DNA ژنومی با آغازگرهای PSh51-1، ۹۸۷ جفت باز بود. الکتروفورز محصول PCR حضور یک تک باند در ناحیه یک کیلوبازی در هر دو نژاد مربوط به *Fom* و همچنین جدایه مربوط به *Fol* را تایید کرد که با اندازه مورد انتظار انطباق داشت (شکل ۴-د). به منظور بررسی توالی شناسایی شده و تعیین صحت آن، ناحیه تکثیر شده حامل ژن اثرگذاری *Fom-SIX1* مربوط به هردو نژاد *Fom* توالی‌یابی شد. صحت توالی در مقایسه با توالی استحصال شده از داده‌های ژنومی قارچ *Fom* و ژن *Fol-SIX1* در سطح نوکلئوتید با استفاده از نرم‌افزار SeqMan بررسی شد. تجزیه نتایج حاصل از توالی‌یابی نشان داد که توالی ژن اثرگذاری *Fom-SIX1* در هردو نژاد *Fom1* و *Fom1.2* کاملاً حفاظت‌شده بوده و هیچ‌گونه تنوعی میان دو نژاد فوق مشاهده نشد. همچنین توالی ژن اثرگذاری *Fom-SIX1* در ژنوم جدایه NRRL 26406 از کشور فرانسه، استحصال‌شده از مؤسسه علمی براد، به طور کامل با جدایه‌های *Fom*، بررسی شده در این مطالعه، یکسان بوده و هیچ تنوعی میان توالی‌های مذکور مشاهده نشد. توالی‌های این ژن به نام *Fom-SIX1* در پایگاه داده‌های بانک ژن با شماره دستیابی KR811364 ثبت شد. این اولین گزارش از ردیابی ژن اثرگذاری *SIX1* در ژنوم *Fom* می‌باشد.

مطالعات پیشین نشان دادند که ژن اثرگذاری *SIX1* نقش مهمی در بیماری‌زایی بیمارگر ایفا می‌کند و تغییر در توالی پروتئینی آن، بر روی توان بیماری‌زایی بیمارگر موثر است. لذا توالی این ژن در درون جمعیت بیمارگر بسیار حفاظت‌شده می‌باشد (Vander Does et al. 2008; Lievens et al. 2009). همچنین براساس مطالعات قبلی، ژن‌های اثرگذاری از جمله *SIX1*، در بین جدایه‌های *F. oxysporum*، توارث افقی داشته که این خود مبین دلیل تشابه بسیار زیاد این ژن در جدایه‌های مختلف است (Ma et al. 2010). قارچ *F. oxysporum* دارای فرم‌های اختصاصی مختلف بوده که برحسب میزبان اختصاصیت‌شان، با نماد f. sp. در امتداد نام گونه مشخص می‌شوند. جدایه‌های متعلق به هر فرم اختصاصی، توانایی بیماری‌زایی بر روی میزبان خاصی را دارا می‌باشد. لذا با توجه به تنوع میزبان در بین فرم‌های اختصاصی، ادامه این بررسی توالی این ژن در میان فرم‌های اختصاصی مختلف مورد مقایسه قرار گرفت.

تاکنون توالی ژن اثرگذاری *SIX1* در *F. oxysporum* f. sp. (*Fol*) *lycopersici* و جدایه FO5176 بیماری‌زا بر روی آرابیدوپسیس (*Foc*)، به طور کامل توالی‌یابی شده‌است. مقایسه ترادف آمینواسیدی حاصل از ترجمه ژن *Fom-SIX1* با ترادف پروتئین *SIX1* در دو فرم اختصاصی *FOL* و *FOC* نشان داد که ژن *SIX1* در بین فرم‌های اختصاصی مختلف دارای تنوع بوده و پروتئین *Fom-SIX1* با دو فرم اختصاصی فوق به ترتیب ۷۶ و ۷۷ درصد شباهت دارد (جدول ۲).

هم‌ردیفی چندگانه میان توالی پروتئین اثرگذاری *Fom-SIX1* با *Fol-SIX1* و *Foc-SIX1* به کمک نرم‌افزار Clustalw2.1 صورت گرفت (شکل ۵-الف) و از نتایج هم‌ردیفی فوق جهت رسم درخت فیلوژنتیکی (فیلوگرام) به روش Neighbor-joining استفاده شد (شکل ۵-ب). نتایج فوق نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه از لحاظ تنوع در ژن *SIX1* در دو گروه مجزا قرار دارند. در گروه اول، جدایه‌های متعلق به دو فرم اختصاصی *Foc* و *Fol* قرار گرفته و جدایه‌های مربوط به فرم اختصاصی *Fom* بیشترین واگرایی را با دو فرم اختصاصی فوق داشته و به‌تنهایی در یک شاخه مجزا جای گرفتند.

های بیماری‌زای گیاهی، پنج خصوصیت مشترک در این پروتئین-ها شناسایی شد که عبارتند از: وزن ملکولی پایین، عدم وجود دمین مشخص، داشتن توالی سیگنال پپتیدی، غنی بودن از اسیدآمین‌ه سیستمین و وجود باندهای دی‌سولفیدی جهت ایجاد ساختار سه‌بعدی پایدار (Rep 2005). لذا در ادامه به مطالعه خصوصیات اثرگذاری پروتئین Fom-SIX1 پرداخته شد. ترجمه ناحیه کدکننده ژن *Fom-SIX1*، به کمک نرم‌افزار MEGA5 نشان-داد که ژن فوق توانایی کد کردن یک پروتئین کوچک به طول ۲۸۳ اسیدآمین‌ه را دارا است. با تجزیه توالی پروتئین فوق در پایگاه SMART، هیچ دمین مشخصی در این پروتئین شناسایی نشد ولیکن یک ناحیه همولوگ مجزا به نام Sucrose-specific porin در محدوده اسیدآمین‌ه‌های ۲۳۰ تا ۲۶۰ و e-value برابر با ۰/۴۱ شناسایی شد. همچنین ۲۱ اسیدآمین‌ه انتهایی آمین به‌عنوان توالی Signal peptide شناسایی و سایت برش احتمالی این توالی سیگنال پپتیدی به کمک برنامه Signal P3 در حد فاصل اسیدآمین‌ه‌های ۲۱ و ۲۲ مشخص شد. نتایج به دست‌آمده فرضیه ترش‌شی بودن پروتئین Fom-SIX1 را کاملاً تایید کرد.

1 **mvpygmvlilgilsvglsgaay**TAQEAAREPQIFNLTAYAEHLKVAASGRSPDNDLPWDDTMSFFWNETDN 75
76 DVQAETGNSLSRRGRVNLKRDPPVGETLNDHVTNDMLQALHDLVQKFGAGHRATSGLGKLRKVSQKPDV 150
151 RGTVGKANAPGEHEETFEAVNFRRLAAKFPVCGARIEVTERHDIGRHTWDGVWYSPSPGTYDSFAQMA 225
226 GSLNGFFDFNGVYSSGEGMSSRGNGHSWSEINCPGGKLTITSTNRATWAGYTSFVAY*

شکل ۶- محصول ترجمه ژن *Fom-SIX1* سیگنال پپتید پیش‌بینی‌شده در انتهای آمین توالی و با حروف کوچک و تیره نوشته شده‌است. فلش مکان احتمالی برش پروتئین را نشان می‌دهد. اسیدآمین‌ه سیستمین با رنگ خاکستری مشخص شده‌است. ناحیه مشخص‌شده با خطوط نقطه‌چین نشانگر یک ناحیه همولوگ مجزا به نام Sucrose-specific porin با SCOP ID: d1a0tp- است. علامت * نشان دهنده کدون خاتمه می‌باشد.

پروتئین‌های اثرگذار پروتئین‌های ترش‌شی هستند که قادرند در فضای بیرون سلولی پایدار باشند. این پایداری به دلیل تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی متعدد در ساختار پروتئین است. حضور اسیدآمین‌ه سیستمین شاخصی برای تشکیل این پیوندها خواهد بود. تجزیه و تحلیل توالی پروتئینی این ژن (بدون در نظر گرفتن ناحیه Signal peptide) حضور هشت اسیدآمین‌ه سیستمین در موقعیت-های ۱۲۰، ۱۳۵، ۱۴۴، ۱۶۰، ۱۶۶، ۱۸۴، ۲۵۴ و ۲۵۷ را نشان‌داد (شکل ۶). پروتئین Fol-SIX1 نیز دارای همین تعداد اسید آمین‌ه

Fol-SIX1-CAE55866.1-E MAPYSMLLGLSILGFGAYAEAAVREPQIFNLTYTEYLDKVAASHG- 49
Fol-SIX1-ACY39281.1-K MAPYSMLLGLSILGFGAYAEAAVREPQIFNLTYTEYLDKVAASHG- 49
Foc-SIX1-AEN94577.1 MAPYSMLLGLSILGFGAYAEAAVREPQIFNLTYTEYLDKVAASHG- 49
Fom-SIX1-R1 MYPYGMVLILGILSVLGSAAAYAEAAVREPQIFNLTAYAEHLKVAASGR 50
Fom-SIX1-R1.2 MYPYGMVLILGILSVLGSAAAYAEAAVREPQIFNLTAYAEHLKVAASGR 50
*** **

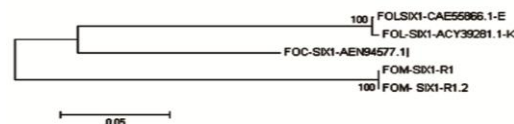
Fol-SIX1-CAE55866.1-E SPFDKSDLFNDTMSFFWNETDGVQETGSSLSRRGIVNLKRRPFG 99
Fol-SIX1-ACY39281.1-K SPFDKSDLFNDTMSFFWNETDGVQETGSSLSRRGIVNLKRRPFG 99
Foc-SIX1-AEN94577.1 SPQDIG-LPNDTMSFFWNETDGVQETGSSLSRRGIVNLKRRPFG 99
Fom-SIX1-R1 SPFDKSDLFNDTMSFFWNETDGVQETGSSLSRRGIVNLKRRPFG 100
Fom-SIX1-R1.2 SPFDKSDLFNDTMSFFWNETDGVQETGSSLSRRGIVNLKRRPFG 100
*** **

Fol-SIX1-CAE55866.1-E EESRNDRVTDQMLQALHDLQVRFSGTGYRAVSGCLYDTRRATRIEKNK 149
Fol-SIX1-ACY39281.1-K EESRNDRVTDQMLQALHDLQVRFSGTGYRAVSGCLYDTRRATRIEKNK 149
Foc-SIX1-AEN94577.1 GEDRNDHVTNDMLQALHDLQVRFSGTGYRAVSGCLYDTRRATRIEKNK 140
Fom-SIX1-R1 WETLNDHVTNDMLQALHDLQVRFSGTGYRAVSGCLYDTRRATRIEKNK 147
Fom-SIX1-R1.2 WETLNDHVTNDMLQALHDLQVRFSGTGYRAVSGCLYDTRRATRIEKNK 147
* **

Fol-SIX1-CAE55866.1-E SVREDRSVTRACPEGQECTTFNAYNFR-NRHHQVTFVPCGPRIEVKDRH 198
Fol-SIX1-ACY39281.1-K SVREDRSVTRACPEGQECTTFNAYNFR-NRHHQVTFVPCGPRIEVKDRH 198
Foc-SIX1-AEN94577.1 GVPGRSGTVDTRACPDHQCCTFEAVNFRSRVHQRVTFVPCGPRIEVKDRH 190
Fom-SIX1-R1 DVGRTVGKANAPCGEHEECTFEAVNFR--RLAAKFPVCGARIEVTERH 194
Fom-SIX1-R1.2 DVGRTVGKANAPCGEHEECTFEAVNFR--RLAAKFPVCGARIEVTERH 194
*

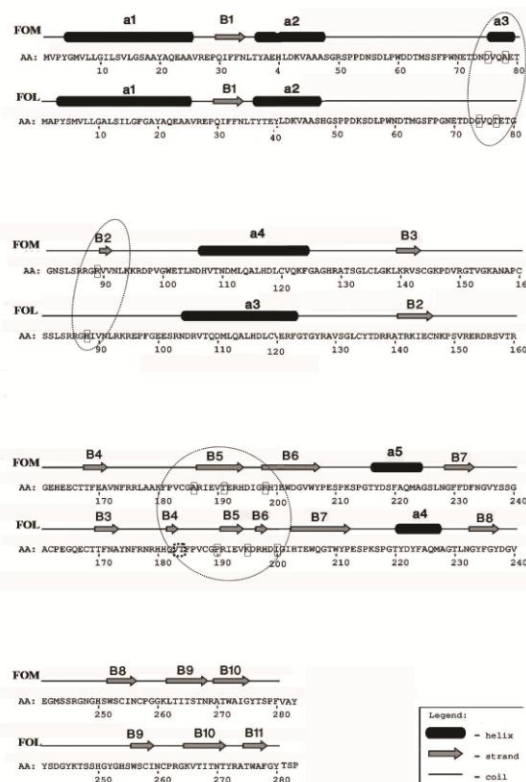
Fol-SIX1-CAE55866.1-E DIGIHTWQGTWYSPSPGTYDSFAQMAAGLNGYFGYDGVYSDGYKTS 248
Fol-SIX1-ACY39281.1-K DIGIHTWQGTWYSPSPGTYDSFAQMAAGLNGYFGYDGVYSDGYKTS 248
Foc-SIX1-AEN94577.1 DIGIHTWQGTWYSPSPGTYDSFAQMAAGLNGYFGYDGVYSDGYKTS 240
Fom-SIX1-R1 DIGIHTWQGTWYSPSPGTYDSFAQMAAGLNGYFGYDGVYSDGYKTS 244
Fom-SIX1-R1.2 DIGIHTWQGTWYSPSPGTYDSFAQMAAGLNGYFGYDGVYSDGYKTS 244
** **

Fol-SIX1-CAE55866.1-E SHGYGHSWGCINCPGKVTITNTYRATWAGYTSFVAY-- 284
Fol-SIX1-ACY39281.1-K SHGYGHSWGCINCPGKVTITNTYRATWAGYTSFVAY-- 284
Foc-SIX1-AEN94577.1 SRGNGHSWGCINCPGKLTITNTYRATWAGYTSFVAY 279
Fom-SIX1-R1 SRGNGHSWGCINCPGKLTITNTYRATWAGYTSFVAY 283
Fom-SIX1-R1.2 SRGNGHSWGCINCPGKLTITNTYRATWAGYTSFVAY 283
* * **



شکل ۵- الف) نتیجه هم‌ردیفی چندگانه میان توالی پروتئین اثرگذاری Fom-SIX1 با Fol-SIX1 و Foc-SIX1 به کمک نرم‌افزار Clustalw2.1 (ب) دندروگرام ترسیم شده از توالی پروتئین SIX1 در سه فرم اختصاصی *F. oxysporum* به روش Neighbor-joining بر اساس ۱۰۰۰ تکرار توسط برنامه Clustalw2.1. شاخص، نمایانگر ۰/۵ تغییر در هر اسیدآمین‌ه است. جدایه‌های مورد بررسی عبارتند از: Fom-SIX1 *F. oxysporum* f. sp. *melonis* race1; Fol-SIX1 *F. oxysporum* f. sp. *melonis* race1.2; Foc-SIX1 *F. oxysporum* pathogenic on *Arabidopsis lycopersici*.

در مطالعات گذشته ژن اثرگذار دیگری به نام *Fom-SIX6* به‌کمک آغازگرهای اختصاصی *Fol-SIX6* در ژنوم *Fom* ردیابی و توالی-یابی شده‌است (Lievens et al. 2009). توالی *Fom-SIX6* در سطح اسیدآمین‌ه دارای ۹۰ درصد تشابه با توالی همولوگ خود در *Fol* است. در مطالعه حاضر پروتئین اثرگذاری *Fom-SIX1* نسبت به *Fom-SIX6* واگرایی تکاملی بیشتری را متحمل شده که احتمالاً به علت نقش مهم این پروتئین در بیماری‌زایی بر روی میزبان خاص است. پیش‌بینی می‌شود میان توان بیماری‌زایی بیمارگر و توالی اسیدآمین‌ه‌ای این ژن ارتباط وجود دارد، لذا مطالعه بیشتر بر روی ساختار و خصوصیات پروتئین *Fom-SIX1* و مقایسه آن با پروتئین‌های همولوگ خود، ضروری به‌نظر می‌رسد. در مطالعات پیشین از مقایسه پروتئین‌های اثرگذار در میان قارچ-



شکل ۷- مقایسه ساختار ثانویه پروتئین SIX1 در دو فرم اختصاصی *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) و *oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom) نواحی با تفاوت‌های ساختاری متمایز درون دایره مشخص شده‌اند. در نواحی مشخص شده از توالی پروتئینی، مستطیل‌های خاکستری نشانگر جهش‌های بدمعنا (جهش‌هایی که سبب جانشینی اسیدآمینه با ساختار فیزیکی‌شیمیایی متفاوت شده‌اند) و مستطیل‌ها با کادر نقطه‌چین نشانگر جهش از نوع حذف می‌باشند.

همچنین چندین تفاوت در ساختار ثانویه پروتئین SIX1 در بین دو فرم اختصاصی فوق مشاهده شد (شکل ۷). احتمالاً وقوع سه جهش بد معنای D75:G74، A78:T77 و R89:H88 که موجب جانشینی اسیدآمینه‌هایی با خصوصیات فیزیکی‌شیمیایی متفاوت شده، سبب ایجاد مارپیچ آلفا 3 و صفحه بتا 2 در توالی پروتئین Fom-SIX1 شده است. دو سازه مذکور در پروتئین Fol-SIX1 وجود ندارد. همچنین سه جهش بد معنای A186:P190، T191:K195 و R198:I200 و حذف دو اسیدآمینه V183 و T184 سبب ایجاد تنوع در تعداد و اندازه صفحات بتا در دو پروتئین Fom-SIX1 و Fol-SIX1 شده است. پروتئین Fol-SIX1، از یک سو نقش مهمی در بیماری‌زایی بیمارگر و کلونیزاسیون میزبان داشته و از سوی دیگر در تقابل مستقیم با ژن‌های مقاومتی میزبان

سیستئین در موقعیت‌های تقریباً مشابه ۱۱۹، ۱۳۴، ۱۴۶، ۱۶۲، ۱۶۸، ۱۸۸، ۲۵۸ و ۲۶۱ است (داده‌ها نمایش داده نشده است). پروتئین Foc-SIX1 نه اسیدآمینه سیستئین در موقعیت‌های ۱۱۰، ۱۲۵، ۱۳۷، ۱۵۳، ۱۵۹، ۱۷۸، ۱۸۰، ۲۵۰ و ۲۵۳ دارد (داده‌ها نمایش داده نشده است). هرچند که دو پروتئین Fol-SIX1 و Foc-SIX1 از نظر توالی اسیدآمینه‌ای نسبت به Fom-SIX1 شباهت بیشتری دارند ولی حذف ده اسیدآمینه در انتهای آمین Foc-SIX1 سبب شده که اختلاف فاحشی میان موقعیت اسیدهای آمینه سیستئین در توالی پروتئینی آن‌ها مشاهده شود. در ادامه توانایی پروتئین فوق در ایجاد یک ساختار سه بعدی پایدار در خارج از سلول مورد مطالعه قرار گرفت. با بررسی توالی پروتئین با نرم‌افزار DiANNA 1.1 وجود چهار باند دی‌سولفیدی در بین سیستئین‌های ۱-۶، ۲-۷، ۳-۴ و ۵-۸ تایید شد. در دو پروتئین Fol-SIX1 و Foc-SIX1 نیز چهار باند دی‌سولفیدی به ترتیب در میان سیستئین‌های (۱-۴، ۲-۸، ۳-۵، ۶-۷) و (۱-۴، ۲-۷، ۳-۵، ۶-۹) شناسایی شد.

در مجموع نتایج فوق این فرضیه را مطرح می‌کند که ژن مفروض *Fom-SIX1* قابلیت کد کردن یک پروتئین کوچک ترشحی غنی از سیستئین و پایدار در محیط خارج سلولی را داراست که فاقد دمن شناسایی شده بوده و با خصوصیات ذکر شده برای پروتئین‌های اثرگذار کاملاً منطبق است (Rep 2005).

تاکنون ساختار دوم پروتئین اثرگذار SIX1 در *F. oxysporum* مورد مطالعه قرار نگرفته است. از آنجا که تاثیر جهش در توالی یک پروتئین به نوع جهش و موقعیت آن ارتباط دارد در این مطالعه ساختار دوم پروتئین فرضی Fom-SIX1 با پروتئین Fol-SIX1 مورد مقایسه قرار گرفت. تجزیه ساختار دوم پروتئین Fom-SIX1 با استفاده از برنامه PSIPred نشان داد که این پروتئین حاوی ۱۰ صفحه بتا و ۵ مارپیچ آلفا بوده که به ترتیب $\alpha 1\beta 1\alpha 2\alpha 3\beta 2\alpha 4\beta 3\beta 4\beta 5\beta 6\alpha 5\beta 7\beta 8\beta 9\beta 10$ در ساختار دوبعدی پروتئین قرار گرفته‌اند (شکل ۷). در حالی که ساختار این پروتئین در فرم اختصاصی Fol دارای ۱۱ صفحه بتا و ۴ مارپیچ آلفا است که ترتیب آن‌ها در ساختار دو بعدی به صورت $\alpha 1\beta 1\alpha 2\alpha 3\beta 2\beta 3\beta 4\beta 5\beta 6\beta 7\alpha 4\beta 8\beta 9\beta 10\beta 11$ بود.

ژنوم *Fom* ردیابی و شباهت آن در سطح نوکلئوتید و پروتئین بررسی شد. با طراحی آغازگرهای اختصاصی حضور این ژن در دو نژاد ۱ و ۱/۲ مربوط به فرم اختصاصی *Fom* تایید شد و طول کامل این ژن توالی‌یابی شد. براساس آنالیزهای صورت گرفته، ژن *Fom-SIX1* در توالی بهم پیوسته فوق بزرگ متفاوتی از ژن *Fom-SIX6* قرار داد و به صورت بالقوه توانایی کد کردن یک پروتئین کوچک ترشحی غنی از سیستئین را دارا می‌باشد. این مطالعه نشان داد ژن *Fom-SIX1* در سطح آمینواسیدی دارای ۷۶ درصد همسانی با پروتئین همولوگ خود در *Fol* است که با توجه به نقش مهم ژن *Fol-SIX1* در بیماری‌زایی بیمارگر *Fol* روی گیاه گوجه‌فرنگی، می‌توان نقش مشابهی را برای ژن جدید شناسایی شده در بیماری‌زایی *Fom* روی گیاه ملون متصور شد. لذا انجام مطالعات تکمیلی روی این ژن بسیار مورد توجه است.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مدیریت پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد سبب مهیا کردن شرایط آزمایشگاهی انجام این تحقیق تشکر می‌کنم. همچنین از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد به جهت فراهم کردن منابع مالی این تحقیق در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۲۸۳۲۵ سپاسگزاری می‌شود.

منابع

Agrawal AF, Lively CM (2002) Infection genetics: gene for gene versus matchin-allels models and all pionts in between. *Evolutionary Ecology Research* 4: 79-90.
 Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
 Broad (2007) Broad Institute of MIT and Harvard, fusarium comparative database. available at http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/MultiHome.html
 Banihashemi Z (2010) Reaction of *cucumis melo* cultivars to race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *mmelonis* the cause of melon vacular wilt. *Iranian Journal of Palntpathology* 49: 11-22. (In Farsi).
 Brefort T, Tanaka S, Neidig N, Doehleemann G, Vincon V (2014) Characterization of the largest effector gene cluster of *ustilago maydis*. *PLoS Pathology* 10: e1003866.
 Buchan DWA, Minneci F, Nugent TCO, Bryson K, Jones DT (2013). Scalable web services for the PSIPRED

است (Rep et al. 2005). لذا به‌نظر می‌رسد این پروتئین در طی روند تکامل به‌منظور فرار از شناسایی شدن توسط ژن‌های مقاوم‌تی میزبان خاص خود متحمل تغییرات ساختاری شده‌است.

نتیجه‌گیری

از زمان کلون کردن اولین ژن اثرگذار *SIX* در *F. oxysporum* f. *lycopersici* sp. *(Fol)* تاکنون، ۱۴ ژن *Fol-SIX* شناسایی شده است (Schmidt et al. 2013). این پروتئین‌های کوچک غنی از سیستئین در آوند گیاه آلوده ترشح می‌شوند و نقش برخی از آن‌ها در بیماری‌زایی و یا عدم بیماری‌زایی *Fol* به‌اثبات رسیده‌است (Rep et al. 2005 ; Houterman et al. 2008 ; Houterman et al. 2009). در گزارشات اولیه این ادعا مطرح شده که ژن‌های *SIX1* تا *SIX5* تنها در فرم اختصاصی *Fol* حضور دارند و می‌توان از آن‌ها به‌عنوان نشانگر جهت شناسایی فرم اختصاصی *Fol* از سایر فرم‌های اختصاصی استفاده کرد (Lievens et al. 2009). ولی در سال‌های اخیر همولوگ ژن *SIX1* در فرم اختصاصی *conglutinans* شناسایی شده که بر روی گیاه آراییدوپسیس ایجاد بیماری می‌کند (Thatcher et al. 2012). بر این اساس در مطالعه حاضر حضور ژن اثرگذار *SIX1* در فرم اختصاصی *Fom* مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور با استفاده از روش‌های مبتنی بر بیوانفورماتیک توالی مشابه ژن *Fol-SIX1* در داده‌های مربوط به

Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Research* 41: 340-348.

Ferre F, Clote P (2005) DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Research* 33: 230-232.

Houterman P, Cornelissen B, Rep M (2008) Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PloS Pathology* 4: e1000061.

Houterman P, Lisong M, Van Ooijen G, De Vroomen M, Cornelissen B, Takken F (2009) The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *Plant Journal* 58: 970-978.

Jones J, Dangl J (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.

- Lawrence GJ, Catanzariti AM, Ayliffe MA, Ellis JG (2004) The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *Plant Cell* 16: 755-768.
- Letunic I, Copley R, Schmid S, Ciccarelli F, Doerks T, Schuitz J (2004) SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Research* 32: 142-143.
- Lievens B, Houterman P, Rep M (2009) Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other forma especiales. *FEMS Microbiology Letter* 300: 201-215.
- Luderer R, Takken FLW, de Wit, PJGM, Joosten, MHAJ (2002) *Cladosporium fulvum* overcomes Cf-2-mediated resistance by producing truncated AVR2 elicitor proteins. *Molecular Microbiology* 45: 875-884.
- Luo M, Wang Y, Frisch D, Joobeur T (2001) Melon bacterial artificial chromosome (BAC) library construction using improved methods and identification of clones linked to the locus conferring resistance to melon *Fusarium* wilt (*Fom-2*). *Genome* 44: 154-162.
- Ma L et al. (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464: 367-373.
- Marshall R, Kombrink A, Motteram J, Loza-Reyes E (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: 756-769.
- NCBI (2013) The National Center for Biotechnology Information. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Petersen TN, Brunak S, Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8: 785-786.
- Rep M, Dekker H, Vossen J, DeBoer A, Houterman P, Speijer D (2002) Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomat. *Plant Physiology* 130: 904-917.
- Rep M, van der Does H, Meijer M, Van Wijk R, Houterman P, Dekker H (2004) A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Molecular Microbiology* 53: 1373-1383.
- Rep M (2005) Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. *FEMS Microbiology Letters* 253: 19-27.
- Rep M, Meijer M, Houterman P, Van der Does H, Cornelissen B (2005) *Fusarium oxysporum* Evades I-3-mediated resistance without altering the matching avirulence gene. *Molecular Plant Microb Interaction* 18: 15-23.
- Sacristan S, Garcia-Arenal F (2008) The evaluation of virulence and pathogenicity in plant pathogen population. *Molecular Plant Pathology* 9: 369-384.
- Schmidt S, Houterman P, Schhriver I, Ma LJ, Amyotte S, Chellappan B (2013) MITEs in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum*. *BMC Genomics* 14: 119-140.
- Solovyev V, Kosarev P, Seledsov I, Vorobyev D (2006) Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. *Genome Biology* 7: 101-112.
- Swindell SR, Plasterer TN (1997) SEQMAN. *Methods in Molecular Medicine* 70: 75-89.
- Takken F, Rep M (2010) The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology* 11: 309-314.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Thatcher L, Gardiner D, Kazan K, Manners J (2012) A highly conserved effector in *Fusarium oxysporum* is required for full virulence on arabidopsis. *Molecular Plant Microb Interaction* 25: 180-90.
- Vander Does H, Duyvesteijn R, Goltstein P, Van Schie C, Manders E, Cornelissen B (2008) Expression of effector gene *SIX1* of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells. *Fungal Genetics and Biology* 45: 1257-1264.
- Vander Does H, Lievens B, Claes L, Houterman P, Cornelissen B, Rep M (2008) The presence of avirulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. *Environmental Microbiology* 10: 1475-1485.
- Vleeshouwers VGAA, Oliver RP (2014) Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Plant Pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27: 196-206.
- Wang Y, Thomas CE, Dean RA (2011) Genetic mapping of a fusarium wilt resistance gene (*Fom-2*) in melon (*Cucumis melo* L.). *Molecular Breeding* 6: 379-389.