ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٤
صفحه ٥١٨-٥٠٧

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

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

فرهاد شکوهی‌فر*[1]، الهه ربیعی مطلق[1]

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

Shokouhifar F*[1], Rabiei-Motlagh E[1]

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

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

(تاریخ دریافت: ٩٣/٥/١٢- تاریخ پذیرش: ٩٤/٢/١٥)

چکیده

درطی فرآیند بیماری‌زایی، عامل *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) پروتئین اثرگذاری به‌نام 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. هومولوگ 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 استفاده‌شد. توالی پروتئین Fol-SIX1 در پایگاه داده WGSFOM با استفاده از ابزار tBLASTN و با حد e-value 0.1 جستجو شد. چهار توالی به هم‌پیوسته (کانتیگ) شناسایی شد که فقط یکی از آن‌ها هم‌پوشانی و شباهت قابل‌قبولی را با Fol-SIX1 دارا بود. توالی به‌هم پیوسته موردنظر بازیابی و ORFهای ممکن با نرم‌افزار VectorNTi پیش‌بینی شد. نتایج نشان داد که توالی ORF ژن مفروض بر روی رشته آنتی‌سنس قرار داشته و پروتئینی به‌طول ٢٨٣ اسیدآمینه 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 Fom-SIX1 نامیده‌شد. 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 دمین شناسایی شده بوده و با خصوصیات ذکر شده برای پروتئین‌های اثرگذار کاملا منطبق است.

واژه‌های کلیدی

همولوگ
Fol-SIX1
Fusarium oxysporum f. sp. *Melonis*
پروتئین ترشحی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.7.9]

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 ارایه شده‌است (Agrawal and Lively 2002; Jones and Dangl 2006; Sacristan and Garcia-Arenal 2008). براساس مدل ارایه 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 ملکولی مرتبط به بیمارگر (PAMPs[1]) سیستم دفاعی مناسبی را جهت بروز مقاومت در خود فعال کنند. این نوع مقاومت را مقاومت القا شده توسط الگوی مولکولی مرتبط با بیمارگر (PTI[2]) 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 اثرگذار[3] (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 اثرگذار[4] (ETI) گفته می‌شود. در این حالت پروتئین اثرگذار شناسایی شده به‌عنوان "فاکتور غیر بیماریزایی" یا Avr[5] 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 این‌ترتیب 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 بیماگر و وجود ژن‌های مقاومتی در میزبان، احتمال وجود ژن‌های اثرگذار در جمعیت بیمارگر *F. oxysporum*f. sp. *melonis* (Fom) 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 SIX[6] 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 فرم‌اختصاصی *Fom* نیز وجود داشته‌باشد.

در میان ژن‌های اثرگذار شناسایی‌شده 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 patterns
[2] PAMP-triggered immunity (PTI)
[3] Effector triggered susceptibility (ETS)
[4] Effector triggered immunity (ETI)
[5] Avirulence factor
[6] Secreted in xylem (SIX)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.7.9]

به طول ۲۸٤ اسیدآمینه کد کرده و در مرحله توسعه قارچ در شبکه آوندی گیاه گوجه‌فرنگی ترشح می‌شود (Rep et al. 2004). مطالعات نشان‌داده این پروتئین ترشحی 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. oxysporium* f. sp. *conglutinans* (*Foc*) منجر به شناسایی همولوگ آن شده و نقش آن در برهمکنش میان این فرم اختصاصی و گیاه آرابیدوبسیس مورد بررسی قرارگرفته‌است (Thatcher et al. 2012). یافتن توالی مشابه ژن‌های اثرگذار می‌تواند در درک بهتر برهمکنش فرم اختصاصی *F. oxysporium* f. sp. *melonis* و گیاه ملون نیز بسیار مؤثر باشد.

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) [1] 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. oxysporum* f. sp. *melonis* استفاده‌شد. برای این‌منظور با استفاده از ابزار tBLASTn (Altschu et al. 1997)، توالی پروتئینی *CAE55866.1* در بانک داده‌های FOM-WGS جستجو شد. پس از آن جفت قطعاتی از توالی که امتیاز همردیفی آن‌ها از آستانه مشخص شده (حد0.1 e-value) بالاتر بود، جهت بررسی بیشتر انتخاب شدند.

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.

جدایه‌های قارچی

دو جدایه *F. oxysporum* f. sp. *melonis* به نام‌های Fom-R1 و Fom-R1.2 (به‌ترتیب متعلق به نژادهای ۱ و۱/۲ بیمارگر) و یک جدایه *F .oxysporum* f. sp. *lycopersici* به‌نام 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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.7.9]

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 این‌منظور، به کمک نرم‌افزار SeqMan (Swindell and Plasterer 1997) مناطق نسبتا حفاظت‌شده در درون توالی ژن مفروض *Fom-SIX1*، که به‌کمک روش‌های بیوانفورماتیکی پیش‌بینی شده‌بود 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 primier 5 یک جفت آغازگر داخلی در مناطق حفاظت شده طراحی و در نهایت کیفیت آغازگر طراحی شده در توالی به‌هم‌پیوسته فوق بزرگ AGNE01001175.1 به‌کمک 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 (جدول۱). برای این‌منظور 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 حفاظت شده 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 primier 5 مشابه بالا ارزیابی‌شد.

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.,) کره‌جنوبی و یک واحد آنزیم تگ‌پلیمراز (Taq DNA Polymerase, GeNetBio, South Korea) اضافه‌شد. برنامه حرارتی پس از بهینه کردن بصورت ۳ دقیقه در ۹۳ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ چرخه با ٤٥ ثانیه در ۹۲ درجه سانتی‌گراد، ٤٥ ثانیه در دمای ٥٦ درجه سانتی‌گراد (برای آغازگرPSh51-2-F/R) یا ۵۸ درجه سانتی‌گراد (برای آغازگرPSh51-1-F/R)، یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله تکثیر نهایی با ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بااستفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Eppendorf) انجام شد. تصویر الگوی باندی 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 ٤ دقیقه در ۹۳ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه با ٤٥ ثانیه در ۹۲ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ٦٢ 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 به‌کمک برنامه MEGA5 تهیه شد. در ادامه، تجزیه و تحلیل‌های بیشتر فقط بر روی توالی پروتئین انجام شد. به‌منظور بررسی حضور ساختارهای دمینی و خصوصیاتی 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 شناسایی‌شد (Petersen et al. 2011).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.7.9]

جدول۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این بررسی

Code	Sequence (5'-3')	Target	Amplicon length (bp)
PSh51-1-F	CCGGATTTTGAGCTTTCGACAA	*SIX1*	987
PSh51-1-R	GAGGGCTTTGGATCGCAACTTA		
PSh51-2-F	TTGGGTCTGCGGCTTATGCTC	*SIX1*	264
PSh51-2-R	GGTCCCGCTTCTTAAGGTTGACA		

```
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     MAPYSMVLLGALSILGFGAYAQEAAVREPQIFFNLTYTEYLDKVAASHG-SPPDKSDLPW  59
             M PY MVLLG LS+LG  AYAQEAAVREPQIFFNLTY E+LDKVAA+ G SPPD SDLPW
Sbjct  2861  MVPYGMVLLGILSVLGSAAYAQEAAVREPQIFFNLTYAEHLDKVAAASGRSPPDNSDLPW  2682

Query  60    NDTMGSFPGNETDDGVQTETGSSLSRRGHIVNLRKREPFGEESRNDRVTQDMLQALHDLC  119
             +DTM SFP NETD+ VQ ETG+SLSRRG +VNL+KR+P G E+ ND VT DMLQALHDLC
Sbjct  2681  DDTMSSFPWNETDNDVQAETGNSLSRRGRVVNLKKRDPVGWETLNDHVTNDMLQALHDLC  2502

Query  120   VERFGTGYRAVSGLCYTDRRATRKIECNKPSVRERDRSVTRACPEGQECTTFNAYNFRNR  179
             V++FG G+RA SGLC       +++ C KP VR         C E +ECTTF A NFR
Sbjct  2501  VQKFGAGHRATSGLCLGK---LKRVSCGKPDVRGTVGKANAPCGEHEECTTFEAVNFRRL  2331

Query  180   HHQVTFPVCGPRIEVKDRHDIGIHTEWQGTWYPESPKSPGTYDYFAQMAGTLNGYFGYDG  239
                  FPVCG RIEV +RHDIG HTEW G WYPESPKSPGTYD FAQMAG+LNG+F ++G
Sbjct  2330  --AAKFPVCGARIEVTERHDIGRHTEWDGVWYPESPKSPGTYDSFAQMAGSLNGFFDFNG  2157

Query  240   VYSDGYKTSSHGYGHSWSCINCPRGKVTITNTYRATWAFGYTSP  283
             VYS G   SS G GHSWSCINCP GK+TIT+T RATWA GYTSP
Sbjct  2156  VYSSGEGMSSRGNGHSWSCINCPGGKLTITSTNRATWAIGYTSP  2025
```

شکل۱- 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.

توالی سیگنال پپتید از محل سایت برش حذف و تعداد و موقعیت اسیدآمینه سیستئین 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

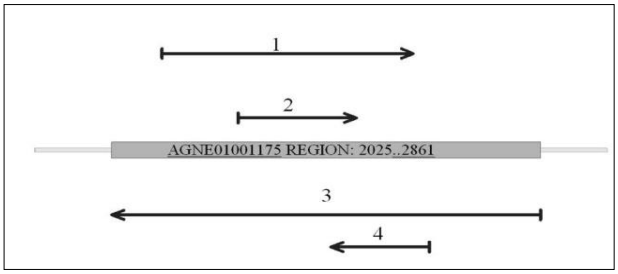
باتوجه به در دسترس بودن توالی ژنوم فرم اختصاصی *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (*Fom*) از طریق NCBI و همچنین موسسه علمی براد، جستجوی توالی مشابه پروتئین اثرگذار Fol-SIX1 انجام شد. نتایج جستجو با استفاده از ابزار tBLASTn به‌شناسایی چهار ناحیه مشابه در داده‌های ژنومی *Fom* با سطح معنی‌داری بین صفر تا ۷/۳ 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 ۲۸٤ اسیدآمینه این پروتئین، ۱۹۳ اسیدآمینه با ناحیه چارچوب خواندنی رشته آنتی‌سنس در منطقه ۲۸٦۱: ۲۰۲۵ از توالی به‌هم‌پیوسته شناسایی شده کاملا یکسان بود و ۲۱۷ اسیدآمینه از نظر ساختاری مشابه بودند (شکل۱).

نتایج بررسی اولیه، حضور توالی مشابه با پروتئین Fol-SIX1 را در رشته آنتی‌سنس از ناحیه ۲۸٦۱: 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. oxysporium* گزارش نشده‌بود، با این حال به‌منظور مشاهده موقعیت توالی شناسایی‌شده 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[1] در خصوص ناحیه شناسایی‌شده در پایگاه بانک ژن وجود نداشت، احتمال حضور ژن در توالی مورد نظر از جنبه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

به‌منظور تایید حضور ژن درناحیه شناسایی‌شده، چارچوب‌های خواندنی ممکن در توالی شناسایی‌شده مورد بررسی قرارگرفت.

[1]Annotated

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.7.9]



شکل۲- چارچوب‌های خواندنی شناسایی‌شده در منطقه 2025:2861 مربوط به توالی به‌هم‌پیوسته AGNE01001175 از ژنوم *F. oxysporum* f. sp. *melonis* ۱-٤) به ترتیب عبارتند از چارچوب‌های خواندنی حامل ١٦٦، ٧٨، ٢٨٣ و ٦٥ کدون قرارگرفته روی رشته‌های سنس و آنتی‌سنس با استفاده از نرم افزار Vector NTi V.11.

نتایج تجزیه توالی کامل به‌هم‌پیوسته AGNE01001175 در نرم‌افزارVector NTi نشان‌داد که در محدوده ٢٨٦١: ٢٠٢٥ دو چارچوب در رشته سنس با ٧٨ و ١٦٦ کدون و دو چارچوب دیگر در رشته آنتی‌سنس با ٢٨٣ و ٦٥ کدون حضور دارد (شکل ٢).

مقایسه نتایج به دست‌آمده با نتایج همردیفی نشان‌داد که چارچوب‌خواندنی حامل ٢٨٣ کدون قرارگرفته در رشته آنتی سنس (چارچوب شماره۳) با توالی پروتئین اثرگذار Fol-SIX1 انطباق دارد. همردیفی جفتی پروتئین کدشونده توسط این چارچوب‌خواندنی با پروتئین Fol-SIX1 این انطباق را تایید کرد (شکل۳). نتایج نشان داد ژن احتمالی شناسایی شده قادر است پروتئینی را کد کند که یک اسیدآمینه کمتر از پروتئین Fol-SIX1 داشته ولی ١٩٣ اسیدآمینه 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 (٣/٥، ٤/٣ و ٧/٣) و همچنین هم‌پوشانی کم با پروتئین Fol-SIX1 مورد توجه قرار نگرفتند (داده‌ها ارایه نشده).

وجود توالی‌های تنظیمی در بالادست ژن شناسایی شده، می‌تواند احتمال صحت واقعی بودن آن را افزایش دهد. لذا ناحیه ژنومی شناسایی‌شده به انضمام حدود ٥٠٠ جفت باز بالا دست و پایین

```
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    MVPYGHVLLGILSVLGSAAYAQEAAVREPQIFFNLTYAEHLDKVAAASGRSPPDNSDLPW  60
            M PY MVLLG LS+LG  AYAQEAAVREPQIFFNLTY E+LDKVAA+ G SPPD SDLPW
Sbjct  1    MAPYSMVLLGALSILGFGAYAQEAAVREPQIFFNLTYTEYLDKVAASHG-SPPDKSDLPW  59

Query  61   DDTMSSFPWNETDNDVQAETGNSLSRRGRVVNLKKRDPVGWETLNDHVTNDMLQALHDLC  120
            +DTM SFP NETD+ VQ ETG+SLSRRG +VNL+KR+P G E+ ND VT DMLQALHDLC
Sbjct  60   NDTMGSFPGNETDDGVQTETGSSLSRRGHIVNLRKREPFGEESRNDRVTQDMLQALHDLC  119

Query  121  VQKFGAGHRATSGLCLGK---LKRVSCGKPDVRGTVGKANAPCGEHEECTTFEAVNFRRL  177
            V++FG G+RA SGLC       +++ C KP VR         C E +ECTTF A NFR
Sbjct  120  VERFGTGYRAVSGLCYTDRRATRKIECNKPSVRERDRSVTRACPEGQECTTFNAYNFRNR  179

Query  178  AAK--FPVCGARIEVTERHDIGRHTEWDGVWYPESPKSPGTYDSFAQMAGSLNGFFDFNG  235
              +  FPVCG RIEV +RHDIG HTEW G WYPESPKSPGTYD FAQMAG+LNG+F ++G
Sbjct  180  HHQVTFPVCGPRIEVKDRHDIGIHTEWQGTWYPESPKSPGTYDYFAQMAGTLNGYFGYDG  239

Query  236  VYSSGEGMSSRGNGHSWSCINCPGGKLTITSTNRATWAIGYTSP  279
            VYS G   SS G GHSWSCINCP GK+TIT+T RATWA GYTSP
Sbjct  240  VYSDGYKTSSHGYGHSWSCINCPRGKVTITNTYRATWAFGYTSP  283
```

شکل۳- نتیجه هم‌ردیفی پروتئین Fol-SIX1 با پروتئین کدشونده توسط چارچوب خواندنی ٢٨٣ کدونی در رشته آنتی‌سنس فرم اختصاصی *F. oxysporium* f. sp. *melonis* نشان‌دهنده انطباق دو توالی و عدم وجود توالی اینترونی در چارچوب‌خواندنی این ژن می‌باشد.

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 ٣ در شکل ٢ انطباق داشت. همچنین جایگاه شروع نسخه‌برداری در فاصله ٢٦٤ جفت باز در بالا دست کدون آغاز و توالی Poly A با فاصله ٣٠ نوکلئوتید در پایین‌دست کدون خاتمه شناسایی شد.

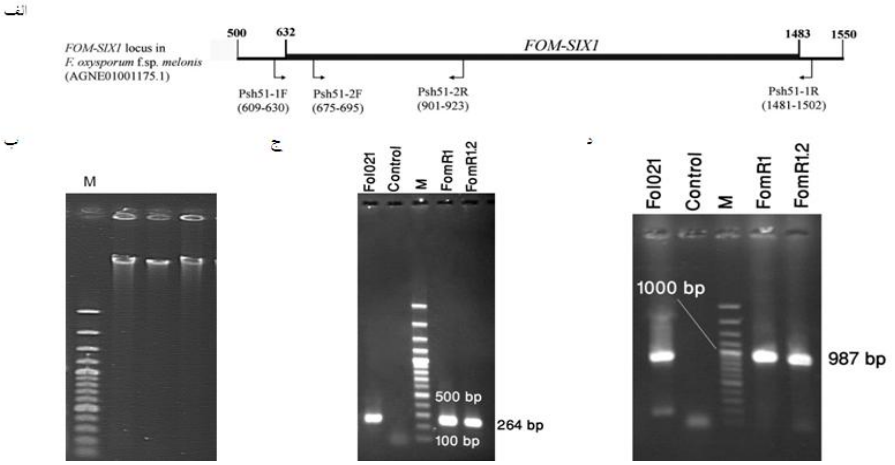
در نهایت به‌منظور تایید نتایج حاصل، موقعیت این ژن بر روی نقشه ژنومی *Fom* تهیه‌شده توسط پایگاه موسسه علمی براد مورد بررسی قرارگرفت. نتایج بدست‌آمده صحت نتایج قبلی را تایید کرد و نشان‌داد که همولوگ ژن *Fol-SIX1* در ژنوم *Fom* بر روی توالی بهم‌پیوسته فوق‌بزرگ (Supercontig) شماره ٥٠٠ و در محدوده ٢٠١٠ تا ٢٨٦١ جفت باز و بر روی رشته آنتی‌سنس قرار گرفته‌است. در این بررسی هیچ توالی EST شناخته شده‌ای در بالادست ژن مفروض شناسایی نشد. همچنین نتایج بدست آمده هم‌پوشانی طول کامل دو همولوگ با ٨٧ درصد شباهت نوکلئوتیدی را نشان داد.

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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.7.9]

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



شکل٤- الف) نمای شماتیک توالی ژن *Fom-SIX1* (مستطیل خاکستری). محل قرار گرفتن آغازگرهای طراحی شده با فلش نمایش داده شده‌است، ب) نتیجه استخراج DNA از میسلیوم جدایه‌های قارچی؛ ج) ردیابی ژن اثرگذار*SIX1* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PSh51-2F/R؛ د) الگوی باندی حاصل از محصول PCR ژن 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* نشانگر وزنی 1 Kb DNA ladder با علامت اختصاری M نشان داده شده‌است.

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 به‌صورت زیر نام‌گذاری می-شوند: {[FO] [f.sp] [strain code] [Six#]}

درصورت نامشخص بودن و یا تفاوت بین فرم‌های اختصاصی، همولوگ شناسایی‌شده به‌نام 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 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 (شکل٤- الف و جدول ۱). ارزیابی جفت آغازگر فوق در توالی به‌هم‌پیوسته 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 شده‌بود، طول قطعه قابل تکثیر از توالی DNA ژنومی با این آغازگرهای اختصاصی ۲٦٤ جفت باز بود (شکل٤- الف). استخراج DNA از بافت میسلیوم 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 زده‌شد (شکل ٤-ب). در الگوی الکتروفورزی محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PSh51-2-F/R، تک باندی در محدوده

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.7.9]

۲۰۰ تا ۳۰۰ جفت باز نشانگر وزنی در هر سه نمونه مشاهده شد (شکل ٤–ج) که با اندازه مورد انتظار ٢٦٤ جفت‌باز انطباق داشت (شکل٤–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 نسبتا 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 این‌منظور، یک جفت آغازگر به نام PSh51-F1/R1 در نواحی حفاظت‌شده خارج از ORF مربوط به *SIX1* طراحی شد (شکل٤– الف). براساس تجزیه‌های صورت‌گرفته 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 (شکل٤–د). به‌منظور 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 کاملا 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 موسسه علمی براد، به طور کامل با جدایه‌های *Fom*، بررسی‌شده 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، در ادامه این بررسی توالی این ژن در میان فرم‌های اختصاصی مختلف مورد مقایسه قرار گرفت.

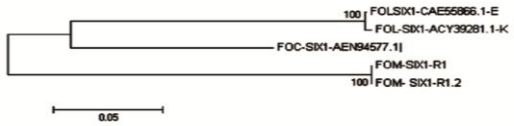
تاکنون توالی ژن اثرگذاری *SIX1* در *F. oxysporum* f. sp. (Fol) *lycopersici* و جدایه FO5176 بیماری‌زا بر روی آرابیدوپسیس (Foc)، به طور کامل توالی‌یابی شده‌است. مقایسه ترادف آمینواسیدی حاصل از ترجمه ژن *Fom-SIX1* با ترادف پروتئین SIX1 در دو فرم اختصاصی *FOL* و *FOC* نشان داد که که ژن *SIX1* در بین فرم‌های اختصاصی مختلف دارای تنوع بوده و پروتئین Fom-SIX1 با دو فرم اختصاصی فوق به‌ترتیب ٧٦ و ٧٧ درصد شباهت دارد (جدول ٢).

هم‌ردیفی چندگانه میان توالی پروتئین اثرگذاری Fom-SIX1 با Fol-SIX1 و Foc-SIX1 به کمک نرم‌افزار Clustalw2.1 صورت‌گرفت (شکل٥–الف) و از نتایج هم‌ردیفی فوق جهت رسم درخت فیلوژنتیکی (فیلوگرام) به روش Neighbor-joining استفاده شد (شکل ٥–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 فرم‌اختصاصی *Foc* و *Fol* قرارگرفته و جدایه‌های مربوط به فرم‌اختصاصی *Fom* بیشترین واگرایی را با دو فرم اختصاصی فوق داشته و به‌تنهایی در یک شاخه مجزا جای گرفتند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.7.9]

```
Fol-SIX1-CAE55866.1-E     MAPYSMVLLGALSILGFGAYAQEAAVREPQIFFNLTYTEYLDKVAASHG- 49
Fol-SIX1-ACY39281.1-K     MAPYSMVLLGALSILGFGAYAQEAAVREPQIFFNLTYTEYLDKVAASHG- 49
Foc-SIX1-AEN94577.1       MAPYSMVLLGALSILGFGAYAQEAAVGEPQVFFNLTFTEYLDKVAASKG- 49
Fom-SIX1-R1               MVPYGMVLLGILSVLGSAAYAQEAAVREPQIFFNLTYAEHLDKVAAASGR 50
Fom-SIX1-R1.2             MVPYGMVLLGILSVLGSAAYAQEAAVREPQIFFNLTYAEHLDKVAAASGR 50
                          *.**.***** **:** .******** ***:*****::*:******: *

Fol-SIX1-CAE55866.1-E     SPPDKSDLPWNDTMGSFPGNETDDGVQTETGSSLSRRGHIVNLRKREPFG 99
Fol-SIX1-ACY39281.1-K     SPPDKSDLPWNDTMGSFPGNETDDGVQTETGSSLSRRGHIVNLRKREPFG 99
Foc-SIX1-AEN94577.1       SPQDIG-LPRNDTMGSFPGN-------ETGSSLSRRGRIVNLRKRAPVE 90
Fom-SIX1-R1               SPPDNSDLPWDDTMSSFPWNETDNDVQAETGNSLSRRGRVVNLKKRDPVG 100
Fom-SIX1-R1.2             SPPDNSDLPWDDTMSSFPWNETDNDVQAETGNSLSRRGRVVNLKKRDPVG 100
                          ** * . ** :***.*** *        ***.******::***:** *.

Fol-SIX1-CAE55866.1-E     EESRNDRVTQDMLQALHDLCVERFGTGYRAVSGLCYTDRRATRKIECNKP 149
Fol-SIX1-ACY39281.1-K     EESRNDRVTQDMLQALHDLCVERFGTGYRAVSGLCYTDRRATRKIECNKP 149
Foc-SIX1-AEN94577.1       GEDRNDHVTNDMLQALHDMCVERFGAGHRATSGLCRPERRATRKFECARP 140
Fom-SIX1-R1               WETLNDHVTNDMLQALHDLCVQKFGAGHRATSGLCLG---KLKRVSCGKP 147
Fom-SIX1-R1.2             WETLNDHVTNDMLQALHDLCVQKFGAGHRATSGLCLG---KLKRVSCGKP 147
                           *  **:**:********:**::**:*:**.****       ::..* :*

Fol-SIX1-CAE55866.1-E     SVRERDRSVTRACPEGQECTTFNAYNFR-NRHHQVTFPVCGPRIEVKDRH 198
Fol-SIX1-ACY39281.1-K     SVRERDRSVTRACPKGQECTTFNAYNFR-NRHHQVTFPVCGPRIEVKDRH 198
Foc-SIX1-AEN94577.1       GVPGRSGTVTRACPDHQICQTFEAYNFRRSVHQKVNFCTCGPKIEVKERH 190
Fom-SIX1-R1               DVRGTVGKANAPCGEHEECTTFEAVNFR---RLAAKFPVCGARIEVTERH 194
Fom-SIX1-R1.2             DVRGTVGKANAPCGEHEECTTFEAVNFR---RLAAKFPVCGARIEVTERH 194
                          .*     ... .* . : * **:* ***   :  ..* .**.:***.:**

Fol-SIX1-CAE55866.1-E     DIGIHTEWQGTWYPESPKSPGTYDYFAQMAGTLNGYFGYDGVYSDGYKTS 248
Fol-SIX1-ACY39281.1-K     DIGIHTEWQGTWYPESPKSPGTYDYFAQMAGTLNGYFGYDGVYSDGYKTS 248
Foc-SIX1-AEN94577.1       DIGRHTEWEGTWYPESPKSPGTYDSFAQMAGSLNGYFDFHGVYSSGEGMS 240
Fom-SIX1-R1               DIGRHTEWDGVWYPESPKSPGTYDSFAQMAGSLNGFFDFNGVYSSGEGMS 244
Fom-SIX1-R1.2             DIGRHTEWDGVWYPESPKSPGTYDSFAQMAGSLNGFFDFNGVYSSGEGMS 244
                          *** ****:*.************* ******:***:*.::****.*   *

Fol-SIX1-CAE55866.1-E     SHGYGHSWSCINCPRGKVTITNTYRATWAFGYTSPH--- 284
Fol-SIX1-ACY39281.1-K     SHGYGHSWSCINCPRGKVTITNTYRATWAFGYTSPH--- 284
Foc-SIX1-AEN94577.1       SRGNGHSWACINCPGGKLTITNTYRPTWALGYTSPYVPY 279
Fom-SIX1-R1               SRGNGHSWSCINCPGGKLTITSTNRATWAIGYTSPFVAY 283
Fom-SIX1-R1.2             SRGNGHSWSCINCPGGKLTITSTNRATWAIGYTSPFVAY 283
                          *:* ****:***** **:***.* *.***:*****.
```



شکل۵- 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. oxyspoum* به روش Neighbor-joining بر اساس ۱۰۰۰ تکرار توسط برنامه Clustalw2.1؛ شاخص، نمایانگر ۰/۰۵ تغییر در هر اسیدآمینه است. جدایه‌های مورد بررسی عبارتند از: Fom-R1) *F. oxysporum* f. sp. *melonis* race1; Fom-R1.2) *F. oxysporum* f. sp. *melonis* race1.2; Fol) *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Foc) *F. oxysporum* pathogenic on Arabidopsis

در مطالعات گذشته ژن اثرگذار دیگری به‌نام *Fom-SIX6* به‌کمک آغازگرهای اختصاصی *Fol-SIX6* در ژنوم *Fom* ردیابی و توالی‌یابی 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 احتمالا 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 قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی، پنج خصوصیت مشترک در این پروتئین‌ها شناسایی شد که عبارتند از: وزن ملکولی پایین، عدم وجود دمین مشخص، داشتن توالی سیگنال پپتیدی، غنی بودن از اسیدآمینه سیستئین و وجود باندهای دی‌سولفیدی جهت ایجاد ساختار سه‌بعدی پایدار (Rep 2005). لذا در ادامه به مطالعه خصوصیات اثرگذاری پروتئین Fom-SIX 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 به‌نام Sucrose-specific porin در محدوده اسیدآمینه‌های ۲۳۰ تا ۲۶۰ و e-value برابر با ۰/۴۱ شناسایی‌شد. همچنین ۲۱ اسیدآمینه انتهای آمین به‌عنوان توالی Signal peptide شناسایی و سایت برش احتمالی این توالی سیگنال پپتیدی به کمک برنامه Signal P3 در حد فاصل اسیدآمینه ۲۱ و ۲۲ مشخص شد. نتایج به دست‌آمده فرضیه ترشحی بودن پروتئین Fom-SIX1 را کاملا تایید کرد.

```
1    mvpygmvllgilsvlgsaay*AQEAAVREPQIFFNLTYAEHLDKVAAASGRSPPDNSDLPWDDTMSSFPWNETDN   75
76   DVQAETGNSLSRRGRVVNLKKRDPVGWETLNDHVTNDMLQALHDLCVQKFGAGHRATSGLCLGKLKRVSCGKPDV   150
151  RGTVGKANAPCGEHEECTTFEAVNFRRLAAKFPVCGARIEVTERHDIGRHTEWDGVWYPESPKSPGTYDSFAQMA   225
226  GSLNGFFDFNGVYSSGEGMSSRGNGHSWSCINCPGGKLTITSTNRATWAIGYTSPFVAY*
```

شکل٦- 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 سیستئین با رنگ خاکستری مشخص شده‌است. ناحیه مشخص‌شده با خطوط نقطه‌چین نشانگر یک ناحیه همولوگ مجزا به‌نام Sucrose-specific porin با SCOP ID: d1a0tp- است. علامت * نشان دهنده کدون خاتمه می‌باشد.

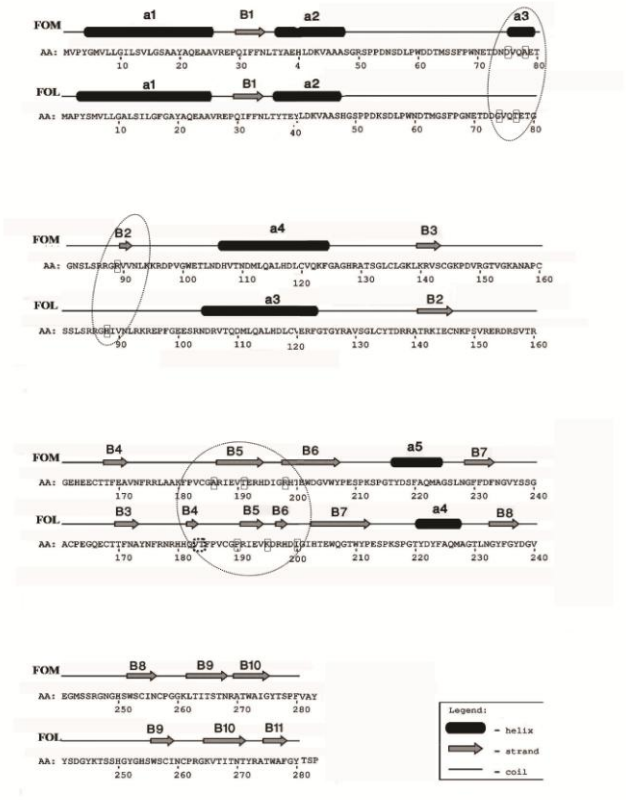
پروتئین‌های اثرگذار پروتئین‌های ترشحی هستند که قادرند در فضای بیرون سلولی پایدار باشند. این پایداری به دلیل تشکیل پیوندهای دی سولفیدی متعدد در ساختار پروتئین است. حضور اسیدآمینه سیستئین شاخصی برای تشکیل این پیوندها خواهد بود. تجزیه و تحلیل توالی پروتئینی این ژن (بدون در نظر گرفتن ناحیه Signal peptide) حضورهشت اسیدآمینه سیستیین در موقعیت‌های ۱۲۰، ۱۳۵، ۱٤٤، ۱٦۰، ۱٦٦، ۱۸٤، ۲٥٤ و ۲٥۷ را نشان‌داد (شکل٦). پروتئین Fol-SIX1 نیز دارای همین تعداد اسید آمینه

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.7.9]

سیستئین در موقعیت‌های تقریبا مشابه ۱۱۹، ۱۳٤، ۱٤٦، ۱٦۲، ۱٦۸، ۱۸۸، ۲۵۸ و ۲٦۱ است (داده‌ها نمایش داده نشده‌است). پروتئین Foc-SIX1 نه اسیدآمینه سیستئین در موقعیت‌های ۱۱۰، ۱۲۵، ۱۳۷، ۱۵۳، ۱۵۹، ۱۷۸، ۱۸۰، ۲۵۰ و ۲۵۳ دارد (داده‌ها نمایش داده نشده‌است). 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 نرم-افزار DiANNA 1.1 وجود چهار باند دی‌سولفیدی در بین سیستئین‌های ۱-٦، ۲-۷، ۳-٤ و ۵-۸ تایید شد. در دو پروتئین Fol-SIX1 و Foc-SIX1 نیز چهار باند دی‌سولفیدی به ترتیب در میان سیستئین‌های (۱-٤، ۲-۸، ۳-۵ ،٦-۷) و (۱-۷، ۲-٤، ۵-۹ و ٦-۸) 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 کاملا منطبق است (Rep 2005).

تاکنون ساختار دوم پروتئین اثرگذار SIX1 در *F. oxysporum* مورد مطالعه قرار نگرفته‌است. 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 پروتین حاوی ۱۰ صفحه بتا و ۵ مارپیچ آلفا بوده که به‌ترتیب α1β1α2α3β2α4β3β4β5β6α5β7β8β9β10 در ساختار دوبعدی پروتئین قرارگرفته‌اند (شکل ۷). در حالی‌که ساختار این پروتئین در فرم اختصاصی Fol دارای ۱۱ صفحه بتا و٤ مارپیچ آلفا است که ترتیب آن‌ها در ساختار دو بعدی به صورت α1β1α2α3β2β3β4β5β6β7α4β8β9β10β11 بود.



شکل۷- مقایسه ساختار ثانویه پروتئین SIX1 در دو فرم اختصاصی *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (*Fom*) و *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). 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 فیزیکوشیمیایی 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). احتمالا وقوع سه جهش بد معنای D75:G74، A78:T77 و R89:H88 که موجب جانشینی اسیدآمینه‌هایی با خصوصیات فیزیکوشیمیایی متفاوت شده، سبب ایجاد مارپیچ آلفا α3 و صفحه بتا β2 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 T184سبب ایجاد تنوع در تعداد و اندازه صفحات بتا در دو پروتئین Fom-SIX1 و Fol-SIX1 شده‌است. پروتئین Fol-SIX1، از یک‌سو نقش مهمی در بیماری‌زایی بیمارگر و کلونیزاسیون میزبان داشته و از سوی دیگر در تقابل مستقیم با ژن‌های مقاومتی میزبان

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.7.9]

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. sp. *lycopersici* (*Fol*) تاکنون، ١٤ 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 فرم‌اختصاصی *conglutinans* شناسایی شده که بر روی گیاه آرابیدوپسیس 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 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 صورت‌گرفته، ژن *Fom-SIX1* در توالی بهم پیوسته فوق بزرگ متفاوتی از ژن *Fom-SIX6* قرار داد و به‌صورت 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 ٧٦ 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. m*melonis* the cause of melon vacular wilt. Iranian Journal of Palntpathology 49: 11-22. (In Farsi).

Brefort T, Tanaka S, Neidig N, Doehlemann 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 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: el000061.

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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.7.9]

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) Efector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other forma especiales. FEMS Microbiolgy 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 Intraction 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 Pthology 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 Intarction 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.7.9]