ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲
صفحه ۳۵۶- ۳۴۹

شناسایی و بررسی الگوی بیانی پروتئین PtGSP1 از زنگ برگ گندم با استفاده از سیستم مخمری

Identification and expression pattern of PtGSP1 protein in wheat leaf rust using YST system

هانیه محمودی‌هاشمی[۱]، بهرام محمدسلطانی*[۱]، فهیمه حسینی‌عقدا[۱]، سیدعلی موسوی‌زاده[۱]، ابراهیم محمودی[۱]، مسعود شمس بخش[۱]

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، دانشجویان کارشناسی‌ارشد و دانشیار دانشگاه تربیت مدرس

Mahmoudi Hashemi H[1], Mohammad Soltani B[*1], Hosseini Aghdayi F[1], Seyed Mosavizade A[1], Mahmoudi E[1], Shamsbakhsh M[1]

1. MSc Student, Assistant Professor, MSc Students and Associate Professor, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: soltanib@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۲۱)

چکیده

بیمارگرهای گیاهی با ترشح پروتئین‌های خود به درون سلول میزبان، سیستم دفاعی گیاه را سرکوب می‌کنند. شناسایی و درک عملکرد پروتئین‌های تزریق شده به درون سلول میزبان در توسعه روش‌های جدید کنترل بیمارگر ضروری است. هدف تحقیق حاضر شناسایی، تعیین توالی و بررسی الگوی بیانی حداقل یکی از ژن‌های کد کننده پروتئین ترشحی در مراحل زندگی بیمارگر زنگ برگ گندم است. به منظور شناسایی ژن‌های رمزکننده پروتئین-های ترشحی در بیمارگرهای قارچی مختلف، از یک مخمر جهش یافته استفاده شد. این مخمر در صورتی قادر به رشد در محیط کشت انتخابی است که cDNA همسانه‌سازی شده درناقل بیانی، دارای توالی سیگنال پپتید باشد. در تحقیق حاضر، ابتدا کتابخانه cDNA زنگ برگ گندم با استفاده از آغازگرهای تصادفی تهیه و در ناقل pYST، همسانه سازی شده و به درون مخمر جهش یافته منتقل شد. از روی توالی‌های ناقصی که به این روش به دست آمد، توالی کامل ژنی که ptGSP1 نامیده شد از بانک اطلاعاتی استخراج و نیز کل cDNA مربوطه تکثیر و تعیین توالی شد و ساختار اگزون و اینترون آن تعیین شد و در بانک اطلاعاتی ثبت (AB831174) و بیان آن در مرحله جوانه زنی مستقل از میزبان و نیز در مرحله ساختار مکینه در مجاورت میزبان گندم نشان داده شد. ویژگی‌های ترشحی بودن، کوچکی نسبی پروتئین حاصله، داشتن نواحی تراغشایی در ساختار پروتئین، بیان ژن در مرحله مکینه‌ای مرتبط با میزبان گیاهی و نیز تکامل سریع آن همه بر دخالت احتمالی این ژن کشف شده و پروتئین مربوطه در بیماریزایی تاکید دارند.

واژه‌های کلیدی

پروتیین ترشحی
زنگ برگ گندم
سیستم مخمری YST
cDNA
PtGSP1

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

گندم مهمترین گیاه زراعی به شمار می‌رود و به عنوان یک محصول استراتژیک توسط بیمارگرهای مختلفی از جمله قارچ‌ها آلوده می‌شود. گندم به بیماری‌های قارچی زنگ سیاه یا ساقه (Stem Rust) زنگ قهوه‌ای یا برگ (Leaf Rust) و زنگ زرد یا خطی (Strip Rust) مبتلا می‌شود Kolmer 1997; Goyeau et al. (2007). عامل بیماری زنگ برگ گندم با نام علمی *Puccinia triticina*، آلودگی را از برگ شروع ولی علایم آن محدود به برگ نیست. در دما و رطوبت مناسب اسپورهای این قارچ طی ۸-۶ ساعت شروع به رشد کرده و اسپورهای جدید طی ۴-۳ روز تولید می شوند و توسط باد به ایجاد آلودگی در مناطق دیگر می پردازند (Kolmer et al. 2007).

اسپور قارچ ابتدا بر روی برگ جوانه زده و خود را از طریق سلول‌های روزنه به سلول‌های لایه‌های درونی برگ رسانده و در آنجا ساختاری به نام مکینه (Haustoria) را می‌سازد که نقش اصلی مبادله مواد و فاکتورهای دخیل در بیماریزایی را به عهده دارد (Mendgen et al. 2000). درک میانکنش مولکولی این بیمارگر با میزبان در مرحله تشکیل مکینه، برای کنترل بیماری بسیار مهم است (Szabo et al. 2007; Hogenhout et al. 2009). بیمارگرها از طریق ترشح پروتئین‌های بیماریزای خود به درون سلولهای گیاهی، زمینه سرکوب سیستم دفاعی گیاه و رشد خود را فراهم می آورند. از این رو کشف پروتئین‌هایی که قارچ زنگ گندم داخل سلول گیاهی ترشح می‌کند، ما را در کنترل این بیمارگر یاری می‌کند (Song et al. 2011).

پروتئین‌های ترشحی و بین‌غشایی نظیر فاکتورهای رشد و گیرنده-های آنها، عوامل شرکت کننده در پیام‌رسانی سلول‌ها و نیز درگیر در ایجاد اتصالات سلولی هستند و می توان داروها را به صورت هدفمند با هدف قرار دادن این پروتئین‌ها به سمت سلول یا بافت مورد نظر هدایت کرد و یا سیستم ایمنی گیاه را علیه آنها تحریک نمود (Clark et al. 2003). پروتئین‌های ترشحی و تراغشایی یوکاریوت‌ها اغلب از طریق مسیر کلاسیک ترشحی به خارج سلول راه می‌یابند و ترشح با ترجمه هم زمان است (Hansen and Walter 1988). مسیرهای کلاسیک ترشح پروتئین، وابسته به حضور پپتید نشانه (Signal peptid) در انتهای آمین پروتئین‌ها می‌باشد. پپتید نشانه از نظر طول و توالی بسیار متغیر است. لذا استفاده از پپتید نشانه برای یافتن پروتئین‌های جدید ترشحی همولوگ در مطالعات بیوانفورماتیکی چندان کار آمد نیست. روش‌های تجربی موفقی برای شناسایی پروتئین‌های ترشحی به کار می‌روند. از جمله این روش‌ها دام اندازی پپتید نشانه با استفاده از ژن گزارشگر، استفاده از ویروس‌های مهندسی شده و جداسازی RNA های متصل به غشا می باشد (von Heijne 1990; Lee et al. 2006).

یافتن کلیه پروتئین‌های ترشحی یک بیمارگر و سپس بررسی دخالت هر یک از آنها در بیماریزایی از اهداف بلند مدت مجموعه های تحقیقاتی متعدد است. در تحقیق حاضر، با هدف گزینش برخی از ژن‌های کد کننده پروتئین‌های ترشحی زنگ برگ گندم، از یک مخمر جهش‌یافته استفاده شد. با این روش، توالی‌های ناقص برخی ژن‌های ترشحی زنگ گندم به دست آمد که توالی کامل یکی از انها به روش‌های تجربی و بیوانفورماتیکی تکمیل و سپس بیان آن در مراحل نموی زنگ برگ گندم بررسی شد. همچنین تنوع توالی آن در سویه‌های جغرافیایی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

کشت و جوانه‌زنی اسپورهای زنگ برگ گندم

برای جوانه زنی اسپورهای زنگ برگ گندم، از محلول جوانه زنی محتوی الکل نونانول (سیگما) استفاده شد: ابتدا ۱/۵ میکرولیتر از الکل نونانول در یک میلی‌لیتر استون حل شده و با آب مقطر اتو کلاو شده به حجم کل ۲۰ میلی‌لیتر رسید. سپس ۲۰ میلی‌لیتر از آب مقطر اتوکلاو شده داخل ظرف پتری‌دیش ریخته و به آن ۱۰ میکرولیتر از محلول جوانه زنی نونانول اضافه شد (Nirmala et al. 2011) سپس به صورت منظم و یکنواخت، اسپورها بر سطح مایع درون تشتک پتری پخش شد. به طوری که کاملاً در تماس هم قرار گرفتند و بعد کاغذ واتمن مرطوب شده با محلول جوانه زنی نونانول را بر روی درب ظرف چسبانده و درب تشتک پتری گذاشته شد. گرچه جوانه‌زنی در شرایط تاریکی برای ۴ تا ۶ ساعت کافی است اما جمع‌آوری اسپورهای جوانه زده شده در روز بعد انجام شد و برای استخراج DNA و RNA مورد استفاده

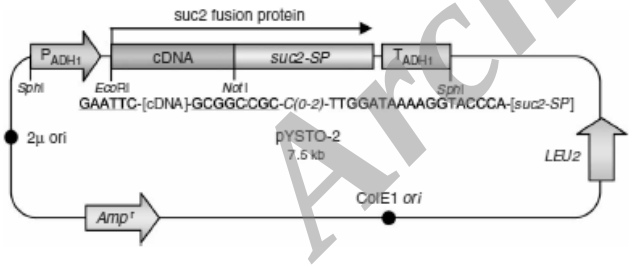
Archive of SID
www.SID.ir

قرار گرفت. برای اطمینان از جوانه‌زنی، اسپورها زیر میکروسکوپ بررسی شدند. شبکه درهم تنیده اسپورهای جوانه زده، امکان برداشت تمامی این جوانه ها را فراهم کرد. برای استخراج مکینه، ابتدا اسپورهای قارچ بر روی برگ گندم جوان (در مرحله دو برگی) پاشیده شد و پس از دو روز برگ‌های آلوده در بافر مناسب و توسط دستگاه مخلوط‌کن خرد شده و با عبور از فیلتر، بافر محتوی مکینه و سلول‌های گیاهی جمع‌آوری شد. سپس با استفاده از شیب سوکرز، لایه محتوی مکینه جمع آوری و برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت (Song et al. 2011).

استخراج RNA و DNA ژنومی از اسپورهای جوانه زده زنگ برگ گندم

اسپورهای جوانه زده یک پلیت (با قطر ۲۰ سانتی‌متر) جمع آوری، منجمد و ساییده شده و جهت استخراج RNA با محلول RNX (شرکت سیناژن، تهران، ایران) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۱۲۰ میکرولیتر کلروفرم به هر نمونه اضافه و با تکان دادن شدید، مخلوط همگن و برای ۵ دقیقه در یخ قرار داده شد. پس از سانتریفوژ میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با شتاب g × ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، در هر میکروتیوب سه فاز تشکیل شد که فاز آبی بالایی به میکروتیوب جدید منتقل شد. هم حجم فاز آبی، ایزوپروپانل به آن اضافه و مخلوط شد و به مدت یک ساعت در یخ نگهداری و سپس دوباره سانتریفیوژ شد. سپس رسوب حاصل با دو میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد شسته شد. پس از سانتریفیوژ رسوب حاصله به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق خشک و۳۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC (۰/۱ درصد) به هر میکروتیوب اضافه شد. میکروتیوب‌های حاوی RNA به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد (Rio et al. 2010).

سنتز cDNA و روش شناسایی cDNA های کد کننده پروتیین-های ترشحی با استفاده از سیستم ترشحی مخمر[1] اینورتاز آنزیمی است که ساکارز را به فروکتوز و گلوکز تجزیه می‌کند. ترشح این آنزیم به خارج سلول مخمر باعث تجزیه ساکارز و در دسترس قرار گرفتن گلوکز مورد نیاز رشد مخمر خواهد شد. مخمر جهش یافته فاقد این آنزیم، قادر به رشد بر روی محیط کشت دارای ساکارز به عنوان تنها منبع کربن و انرژی نیست مگر اینکه ژن کد کننده این آنزیم که به همراه سیگنال ترشحی است، در اختیار سلول قرار گرفته و در نتیجه آنزیم حاصله بتواند از سلول خارج شود. یک ناقل پلاسمیدی شاتل بنام pYST ساخته شده است (Lee et al. 2006) که دارای ژن اینورتاز می‌باشد (شکل۱). آنزیم اینورتاز کد شده توسط این ژن (*suc2*) قادر به خروج از سلول نیست زیرا فاقد توالی سیگنال پپتید است (*suc2-SP*). در نتیجه حتی اگر این ناقل شاتل به درون مخمر منتقل شود باز مخمر مذکور قادر به رشد بر روی محیط انتخابی دارای ساکارز نخواهد بود. تنها در صورتی اینورتاز تولید شده توسط این ناقل از سلول خارج می شود که یک توالی سیگنال پپتید در بالا دست این ژن کلون شود. در صورتی که کتابخانه cDNA زنگ برگ گندم یا هر موجود زنده دیگری در بالا دست ژن اینورتاز مستقر بر ناقل بیانی pYST کلون شود، هر cDNA که دارای سیگنال پپتید باشد ممکن است منجر به ترشح اینورتاز به خارج سلول مخمر شده و گلوکز لازم برای رشد مخمر را فراهم کند (شکل۱). جهت بهینه - سازی و تضمین درستی چارچوب خوانش کدون‌ها از سه ناقل (pYST0، pYST1 و pYST2) استفاده شد که هر یک حاوی ژن گزارشگر اینورتاز با قالب‌های خواندنی متفاوت می‌باشند (Clark et al. 2003).



شکل۱- نمای شماتیک از ناقل بیانی pYST که در *E.coli* و مخمر کار آمد است. cDNA حاصل از RNA استخراج شده از زنگ گندم به دنبال ژن اینورتاز فاقد سیگنال پپتید (*suc2-SP*) در پایین دست راه‌انداز (PADH1) کلون شده است (Clark et al. 2003).

کیفیت RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز تعیین و سپس با استفاده از دستگاه طیف سنجی، کمیت آن تعیین شد. سپس cDNA دو رشته‌ایی با استفاده از کیت SMART محصول شرکت

[1] Yeast secretion trap

Archive of SID
www.SID.ir

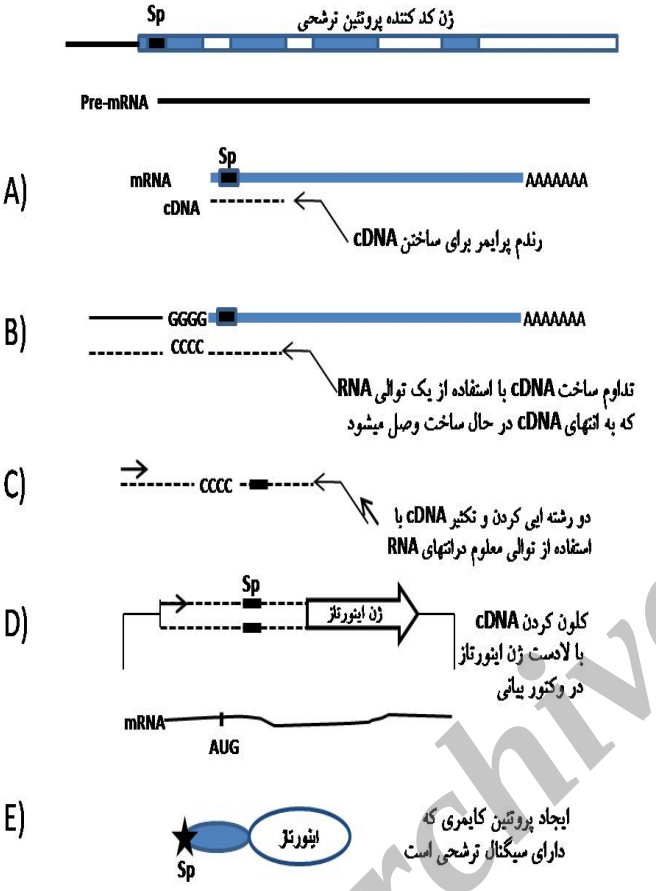
(USA ,Clontech) تهیه شد. این کیت ضامن تهیه cDNA دو رشته‌ای بویژه از ناحیه بالادست ژن است که محل حضور سیگنال پپتید ژن‌ها است (شکل۲) (Lee et al. 2006). سپس این کتابخانه cDNA با دو آنزیم *Not*1 و *Eco*R1 بریده و پس از الحاق به ناقل‌های سه گانه pYST0, pYST1, pYST2 ناقل‌های نوترکیب حاصل به روش انتقال شیمیایی به باکتری مستعد *E.coli* سویه DH5α انتقال یافت. پس از تکثیر باکتری‌های نوترکیب، ناقل‌ها از باکتری استخراج و با روش انتقال الکتریکی به مخمر جهش یافته مستعد منتقل شد. سپس مخمرها بر روی محیط انتخابی ساکارز کشت داده شدند. پس از یک هفته ناقل از مخمر نجات یافته استخراج و توالی‌یابی به روش dideoxychain termination توسط دستگاه ABI انجام شد.

نتایج و بحث

اسپورهای زنگ برگ گندم از نژاد (R1, BBB) از موسسه تحقیقات کشاورزی کانادا تهیه و پس ازجوانه زنی، RNA آنها استخراج و نسبت به ساخت cDNA دو رشته‌ای اقدام شد. مجموعه cDNA مذکور داخل ناقل‌های سه گانه بیانی pYST0-2 همسانه‌سازی و به داخل مخمر منتقل و نسبت به کشت گزینشی آن ها بر روی محیط کشت واجد ساکارز اقدام شد.

کلنی‌های انتخابی برای استخراج پلاسمید به صورت انبوه کشت شدند و قطعه cDNA موجود در آن‌ها تعیین توالی شد. سه توالی به دست آمده از سه کلنی مستقل دارای توالی‌های مشترک بودند و نتیجه‌گیری شد که این سه توالی مربوط به یک ژن هستند. توالی مشترک این سه کلون که ۹۷ جفت باز طول داشت، در شکل۳ تحت عنوان "توالی بالادست ژن" آمده است. نرم‌افزارهای پیش‌بینی سیگنال پپتید نظیر signalp توالی ۲۵ آمینو اسیدی ابتدای این توالی را به عنوان سیگنال پپتید شناسایی کردند.

توالی‌های مشابه با توالی ۹۷ جفت بازی بالادست ژن در بانک اطلاعاتی مربوط به زنگ گندم (FGI) جستجو و فقط یک توالی متناظر در مجموعه EST های سایت مذکور یافت شد که نشان می‌دهد این توالی ۹۷ جفت بازی بخش بالا دست این ژن (PTTG-0136304) می‌باشد. سپس کل cDNA مربوطه تکثیر و تعیین توالی شد. چهار اگزون و سه اینترون در ژن متناظر با این توالی، پیش‌بینی شده است. با ترجمه بیوانفورماتیکی محتمل‌ترین الگوی ترجمه (توالی ORF)، یک پروتئین ۶۹ آمینو اسیدی با وزن ۶/۸۲ کیلو دالتون بدست می‌آید که دارای دو ناحیه استقرار در غشا (transmembran domains) است.



شکل۲- مراحل ساخت cDNA و کلون سازی در بالا دست ژن اینورتاز در ناقل pYST. A) با استفاده از الحاق یک توالی oligoRNA با توالی شناخته شده به انتهای بالادست تمام mRNAها، پیش از سنتز cDNA و با استفاده از کیت های آماده نظیر SMART، تضمین می‌شود که در انتهای تمام cDNAهای ساخته شده یک توالی شناخته شده قرار گیرد؛ B) برای اجتناب از کدون ختم و نیز کم کردن طول cDNA مورد استفاده، از آغازگر تصادفی در سنتز cDNA استفاده می‌شود؛ C) دو رشته ای شدن cDNA و همسانه‌سازی آن بالا دست ژن اینورتاز در مرحله بعد؛ D) ارسال سازه تولید شده به مخمر و بیان محتمل پروتئین ترکیبی و قابل ترشح به بیرون سلول مخمر؛ E) تصویر شماتیک از یک پروتیین ترشحی کایمری با اینورتاز.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱- آغازگرهای مورد استفاده در تحقیق حاضر

نام آغازگرها	توالی (′3 -′5)	کاربرد
GSP1- F1	5′-ATGCAATTCTTCACTGCCGTTG-3′	جهت تکثیر *Pt*GSP1
GSP1- R1	5′-TAAATAAAAAAGCCCAGCTGAATC-3′	
GSP1-F2	5′–GCGGCCAACGTTGCTACCCT-3′	جهت تکثیر *Pt*GSP1
GSP1-R2	5′-AGCCAGCGAGCGGGATCTGA-3′	
TUB-F	5′-GAGATGACCATGTCCTGCTTCGA-3′	جهت تکثیر ژن کنترل داخلی
TUB-R	5′-GACTGACTTTGGCGGTGTCTGA-3′	
Random Primer	5′-GAGAGAGAGAGAGAGAACCGCGCGGCCGCNNNNNN-3′	جهت ساخت cDNA

(توالی بالا دست ژن)
> GSP1 upstream sequence

ATGCAATTCTTCACTGCCGTTGTTGCCCTGATCGCCTGTACCGGTGTTTTCGCCCCCGCTCCCACCGAAGCCACCAA
CTACCCTTGAACCCCGACA

(توالی کامل ژن)
> Genomic DNA of ptGSP1

TTGCCCCTTTTTATCATTCCAACATCGAATATTATATAACCACTCTTAGGCTTGACAGGTCTCAGCTCTCAACTCTAC
CCCTTCAACCTTGCCCAGCTCTTTTGCCCTTTTTCCCGAGACAAGATGCAATTCTTCACTGCCGTTGTTGCCCTGATC
GCCTGTACCGGTAAGTTGAGGGTTTGACTCACTTGCGATGTGAGTCTGGAAGCTGTGACTAACCGTTTCCTACTAC
TCTTCTGACCAAACAGGTGTTTTCGCCGCCCCCGCTCCCACCGAAGCCACCAAGTAAGTTCTCAATGTTACTCACTA
TTTTCGTCTCACCGTTTCCGTCTTAGACCTTGCCTTTCGTTGTAGAACTACCCTTGAACCCCGACAATTTGGAGGTTG
GGGACCCGCTGGTGCGGTCGCGCAGGCGGCCAACGTTGCTACCCTCGGAGCTTTCGGCGGTGGATTCGGTGGAC
CTTTCGGATGGGGAGGATGGTAATCAATCCAAGTTAGTGGGCATATTTCAGAAGACCTCACCTCACATCAATCACT
CGCTAACCAATCAATCAAACATTTGTGCTAAATCCAGAGCCAACAGATCAGATCCCGCTCGCTGGCTATTTGCTAT
GGCAAATCCGACGTCGCACGATTATCCGATTCCATCATGTCTCAATTTTCACTTCATGCTTTTTTTGATTCAGCTGGG
CTTTTTTATTTAGCTGTGGACTTTTAAGTAGCTAGCTACTGCGCAATTTCATAGTGGTTATTTCACAAACTCGCCTTG
TTGCCCCTGTGGTCCTGAGTCGATATTAGT

(توالی پروتئین احتمالی)

> PtGSP1 putative protein

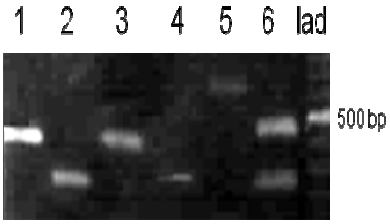
MQFFTAVVALIACTGVFAAPAPTEATKTTLEPRQFGGWGPAGAVAQAANVATLGAFGGGFGGPFGWGGW

شکل۳- توالی ژنی و پروتئین احتمالی ptGSP1 متناظر با توالی ۹۷ بازی یافت شده از طریق سیستم pYST. در قسمت بالا، توالی ۹۷ بازی کشف شده به روش استفاده از مخمر جهش‌یافته آمده است. در قسمت وسط، توالی کامل ژن مشخص شده که از سایت FGI بدست آمده است. اگزون‌ها به صورت نواحی زرد رنگ و کدون‌های شروع و ختم ترجمه با رنگ قرمز مشخص شده‌اند. محل آغازگرهای استفاده شده در واکنش‌های RT-PCR در توالی به صورت نواحی پر رنگ مشخص شده‌اند. در قسمت پایین، توالی پروتئین ترشحی پیش‌بینی شده نشان داده شده است.

ژن و پروتئین احتمالی به ترتیب *ptGSP1* و ptGSP1 نامیده شد و در بانک اطلاعاتی تحت شماره AB831174 ثبت شد.

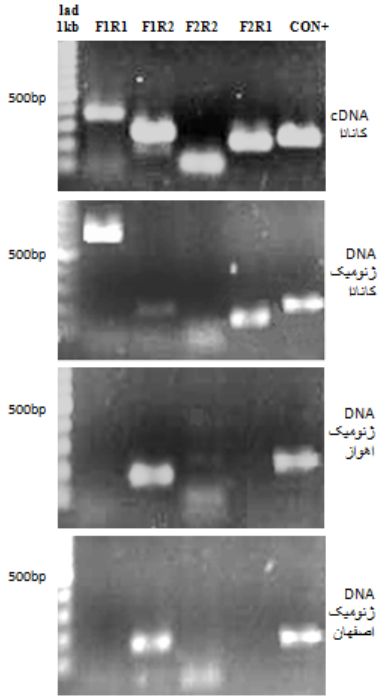
زنگ برگ گندم دارای مراحل متعدد سیکل زندگی است ولی در تحقیق حاضر روی دو مرحله مهم جوانه زنی و نیز تشکیل ساختار مکینه تمرکز شد. لذا RNA را از اسپورهای جوانه زده شده و نیز مکینه‌های تغلیظ شده زنگ برگ گندم نژاد کانادایی، استخراج و با استفاده از آغازگر oligo-dt، نسبت به تشکیل cDNA اقدام شد. سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (به نامهای GSP-F1 و GSP-R1 در جدول-۱) واکنش PCR انجام و بیان این ژن در دوره‌های مختلف زندگی قارچ بررسی و تایید شد (شکل۴).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۴- بیان ژن PtGSP1 در دو مرحله زندگی زنگ برگ گندم به روش RT-PCR. ستون۱) تکثیر ژن PtGSP1 از روی cDNA حاصل از اسپور جوانه زده؛ ستون۲) تکثیر ژن توبولین از روی cDNA حاصل از اسپور جوانه زد؛ ستون۳) تکثیر ژن PtGSP1 از روی cDNA حاصل از مکینه؛ ستون۴) تکثیر ژن توبولین از روی cDNA حاصل از مکینه؛ ستون۵) تکثیر ژن PtGSP1 از روی DNA ژنومی حاصل از اسپور جوانه زده؛ ستون۶) تکثیر ژن توبولین از روی DNA ژنومی حاصل از اسپور جوانه زده. در این تصویر، ستون اول نشان می‌دهد که ژن *PtGSP1* در مرحله جوانه‌زنی اسپور قارچ بیان دارد. ستون دوم و چهارم نشان می‌دهد که واکنش سنتز cDNA به درستی انجام شده است به گونه‌ای که cDNA ژن کنترل داخلی توبولین در هر دو مرحله تکثیر شده است. ستون سوم نیز نشان می‌دهد که ژن *Pt*GSP1 در مرحله مکینه نیز بیان دارد. ستون پنجم و ششم نشان می‌دهد آنچه به‌عنوان cDNA ژن‌ها در ستون‌های اول تا چهارم تکثیر شده ناشی از تکثیر DNA ژنومی ژن *PtGSP1* و یا توبولین نبوده است زیرا در این صورت اندازه باندهای تکثیر شده بزرگتر می‌شد.

در فصل بهار مقداری اسپور زنگ برگ گندم از شهرهای اصفهان و اهواز جمع‌آوری و برای استخراج DNA قارچ زنگ برگ جوانه‌زده استفاده شد. DNA استخراج شده از اسپور جوانه‌زده زنگ برگ تعیین غلظت شده و غلظت تقریبی ۴۰۰ نانوگرم درهر میکرولیتر برای هر سویه تهیه شد. سپس واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن توبولین به عنوان کنترل و آغازگرهای GSP1-F1، GSP1-R1، GSP1-F2 و GSP1-R2 (جدول۱) انجام شد. در مواردی که از آغازگر GSP1-R1 در ترکیب اغازگرهای واکنش PCR استفاده شده، هیچ محصولی از DNA ژنومیک ایزوله‌های زنگ برگ اهواز و اصفهان بر روی ژل آگارز مشاهده نشد. اما در مواردی که از سایر آغازگرهای اختصاصی استفاده شده، محصول مورد انتظار PCR به دست آمده است (شکل۵). این نتایج بیانگر اختلاف توالی ژن *PtGSP1* در دو ایزوله جغرافیایی کانادا و ایرانی در محل آغازگر GSP1-R1 می‌باشد.



شکل۵- نتایج تکثیر نواحی ژن *PtGSP1* از روی DNA ژنومی سویه‌های جغرافیایی کانادایی و ایرانی زنگ برگ گندم. ترکیب آغازگرهای استفاده شده در بالای تصویر نوشته شده است. F1R1 به معنی استفاده از آغازگرهای GSP1-F1 به اضافه GSP1-R1 در واکنش PCR است. به همین ترتیب F2 به معنی GSP1-F2 و R2 به معنی GSP1-R2 می‌باشد. عنوان lad مشخص کننده قطعات DNA نشانه است. واکنش کنترل مثبت روند PCR به صورت CO+ نشان داده شده است. همچنانکه از واکنش‌های انجام گرفته بر روی cDNA سویه کانادایی برمی آید، تمامی آغازگرها کارآمد بوده‌اند.

پروتئین‌های ترشحی در مراحل آغازین ایجاد آلودگی توسط قارچ، شناسایی میزبان، اتصال و چسبندگی به میزبان، فرآیند انتقال سیگنال، مراحل ریخت‌زایی و نفوذ در اپیدرم سلول میزبان نقش دارند. این پروتئین‌ها توسط قارچ به فضای میان قارچ و سلول میزبان و یا حتی به درون سلول میزبان ترشح می‌شوند (Catanzariti et al. 2006). این پروتئین‌ها به آسانی هدف دارو قرار می‌گیرند و به علت اینکه در فضای خارج سلولی و یا در سطح سلول قرار دارند ارزش بالقوه‌ای در تشخیص انواع بیماری-ها دارند. یک پروتئین ترشحی بیمارگر که سلول گیاهی گیرنده آن را دارد می‌تواند مستقیماً به عنوان واکسن مورد استفاده قرار گیرد و یا توسط آنتی‌بادی مورد هدف قرار گیرد (Bolton et al. 2008).

Archive of SID

www.SID.ir

اخیراً مجموعه‌ای از پروتئین‌های کوچک احتمالاً دخیل در بیماریزایی، از مکینه زنگ برگ گندم و به روش استفاده از ژل دو بعدی به دست آمده است که ترشحی بودن و یا نقش هیچکدام از آن‌ها در بیماریزایی به اثبات نرسیده است (Song et al. 2011). گرچه روش‌های بیوانفورماتیکی قادرند نواحی خاص پروتئین‌های ترشحی از جمله توالی سیگنال پپتید و جایگاه برش آنزیم سیگنال پپتیداز را شناسایی کنند، اما روش‌های تجربی نظیر گزینش ژن-های کد کننده پروتئین‌های ترشحی با استفاده از مخمرجهش‌یافته در شناسایی پروتئین‌های ترشحی سایر موجودات موفق بوده‌اند (Friedman and Weissman 1991; Klee and Ellis 2005).

در تحقیق حاضر به منظور کشف پروتئین‌های ترشحی، اسپورهای زنگ برگ گندم (Racr 1; BBB) جوانه زنی شده و RNA آنها استخراج و کتابخانه cDNA ساخته شد. سپس مجموعه cDNA مذکور به داخل ناقل‌های سه‌گانه بیانی pYST0-2 متصل و به داخل مخمر DBY1 منتقل شد و پس از کشت گزینشی آن‌ها بر روی محیط کشت واجد ساکارز اقدام به استخراج پلاسمید و تعیین توالی آن‌ها شد. از سه کلون مستقل یک توالی مشترک ۹۷ جفت بازی تنظیم شد و نتیجه‌گیری شد که این سه توالی مربوط به یک ژن کد کننده پروتئین ترشحی مشترک بوده‌اند. توالی ژن مذکور در سایت FGI به صورت کامل استخراج و نسبت به تعیین و پیش‌بینی ناحیه رمز کننده آن اقدام شد. در کل، این روند بیانگر کارایی سیستم گزینشی مخمر در خصوص حداقل بخشی از ژنهای کد کننده پروتین‌های ترشحی زنگ برگ گندم می‌باشد. چنین سیستمی در خصوص کشف پروتئین‌های ترشحی سایر قارچ‌ها (Delgado et al. 2003; Link and Voegele 2008; Krijger et al. 2008; Lee and Rose 2012) و یا حتی انسان (Frost and Engelhardt 2007) نیز کارآمد بوده است. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بیان این ژن که *PtGSP1* نامیده شد، در سطح RNA در دو دوره اصلی زندگی قارچ بررسی و تایید شد (شکل۴). با توجه به بیان این ژن در هر دو مرحله جوانه زنی مستقل از میزبان و مرحله مکینه وابسته به حضور میزبان، احتمالاً این پروتئین در پدیده‌های غیربیماریزایی نیز دخالت دارد. چون ژن‌های دخیل در بیماریزایی میکروب‌ها در معرض فشار گزینشی شدیدی هستند که عمدتاً روی توالی پروتئینی آن‌ها اعمال می‌شود (Rep 2005)، اگزون‌های این ژن‌ها سریعتر از اینترون‌ها جهش می‌یابند. این فرضیه در خصوص ژن *PtGSP1* مورد بررسی قرار گرفت. برخی از آغازگرهایی که برای تکثیر موفق cDNA ژن *Pt*GSP1 و یا خود ژن از DNA ژنومی زنگ برگ کانادایی استفاده شده بودند (شکل۵)، قادر به تکثیر این ژن در سویه‌های زنگ برگ گندم اصفهان و اهواز نشدند. این نتایج پیشنهاد می‌کند توالی ژن *PtGSP1* بین سویه‌های کشورها متفاوت است و دارای سرعت بالایی از تنوع توالی ژنتیکی در سویه‌های جغرافیایی است که در مقالات تحت عنوان تکامل به کار گرفته شده است. نهایتاً، تحقیق حاضر منجر به کشف یک ژن کد کننده پروتئین ترشحی کوچک در زنگ گندم شده است که ویژگی‌های ترشحی بودن، کوچکی نسبی پروتئین حاصله، داشتن نواحی تراغشایی در ساختار پروتئین، بیان ژن در مرحله مکینه‌ای و نیز تکامل سریع آن همه پیشنهادکننده دخالت احتمالی این پروتئین در بیماریزایی هستند.

منابع

Bolton MD, Kolmer JA, Garvin DF (2008) Wheat leaf rust caused by Puccinia triticina. Molecular Plant Pathology 9:563-75.

Catanzariti AM, Dodds PN, Lawrence GJ, Ayliffe MA, Ellis JG (2006) Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. Plant Cell 18:243-56

Clark HF, Gurney AL, Abaya E, Baker K, Baldwin D, Brush J, Chen J, Chow B, Chui C, Crowley C, Currell B, Deuel B, Dowd P, Eaton D, Foster J, Grimaldi C, Gu Q, Hass PE, Heldens S, Huang A, Kim HS, Klimowski L, Jin Y, Johnson S, Lee J, Lewis L, Liao D, Mark M, Robbie E, Sanchez C, Schoenfeld J, Seshagiri S, Simmons L, Singh J, Smith V, Stinson J, Vagts A, Vandlen R, Watanabe C, Wieand D, Woods K, Xie MH, Yansura D, Yi S, Yu G, Yuan J, Zhang M, Zhang Z, Goddard A, Wood WI, Godowski P, Gray A (2003) The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment. Genome Research 13: 2265-70

Delgado ML, Gil ML, Gozalbo D (2003) Candida albicans TDH3 gene promotes secretion of internal invertase when expressed in *Saccharomyces cerevisiae* as a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-invertase fusion protein. Yeast 20:713-22

Friedman J, Weissman I (1991) two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin p. one in the presence and one in the absence of CsA. Cell 66:799-806.

Archive of SID
www.SID.ir

Frost RJ, Engelhardt S (2007) A secretion trap screen in yeast identifies protease inhibitor 16 as a novel antihypertrophic protein secreted from the heart. Circulation 116:1768-75

Goyeau H, Halkett F, Franc M¸ Carlier J, Lannou C (2007) Clonality and hostselection in the wheat pathogenic fungus Puccinia triticina. Fungal Genetics and Biology 474-483.

Hansen W, Walter P (1988) Prepro-carboxypeptidase Y and a truncated form of pre-invertase, but not full-length pre-invertase, can be posttranslationally translocated across microsomal vesicle membranes from Saccharomyces cerevisiae. Journal of Cell Biology 106: 1075-81.

Hogenhout SA, Van der Hoorn RA, Terauchi R, Kamoun S (2009) Emerging concepts in effector biology of plant associated organisms. Molecular Plant Microbe interactions 22:115-22.

Klee EW, Ellis LB (2005) Evaluating eukaryotic secreted protein prediction. BMC Bioinformatics 6: 256.

Krijger JJ, Horbach R, Behr M, Schweizer P, Deising HB, Wirsel SG (2008) The yeast signal sequence trap identifies secreted proteins of the hemibiotrophic corn pathogen Colletotrichum graminicola. Molecular Plant Microbe Interactions 21:1325-36

Kolmer JA, Oelke LM, Liu GQ (2007) Genetics of leaf rust resistance in three Americano landrace-derived wheat cultivars from Uruguay. Plant Breeding 126: 152-157

Kolmer JA (1997) Virulence in *Puccinia recondita* f. sp. tritici Isolates from Canada to genes for adult-plant resistance to Wheat leaf rust. Plant Disease 81:267-271

Lee SJ, Kim BD, Rose JK (2006) Identification of eukaryotic secreted and cell surface proteins using the yeast secretion trap screen. Nature Protocols 1: 2439-47

Lee SJ, Rose JK (2012) a yeast secretion trap assay for identification of secreted proteins from eukaryotic phytopathogens and their plant hosts. Plant Fungal Pathogens 835:519-30

Link TI, Voegele RT (2008) Secreted proteins of Uromyces fabae: similarities and stage specificity. Molecular Plant Pathology 9:59-66

Mendgen K, Struck C, Voegele RT, Hahn M (2000) Biotrophy and rust haustoria. Physiological and Molecular Plant Pathology 56: 141-145

Nirmala J, Drader T, Lawrence PK, Yin C, Hulbert S, Steber CM, Steffenson BJ, Szabo LJ, von Wettstein D, Kleinhofs A (2011) Concerted action of two avirulent spore effectors activates Reaction to Puccinia graminis 1 (Rpg1)-mediated cereal stem rust resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 108:14676-81.

Rep M (2005) Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. FEMS Microbiology Letters 253:19-27.

Rio DC, Ares MJr, Hannon GJ, Nilsen TW (2010) Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). Cold Spring Harbor Protocols.doi:10.1101/pdb.prot5439

Song X, Rampitsch C, Soltani B, Mauthe W, Linning R, Banks T, McCallum B, Bakkeren G (2011) Proteome analysis of wheat leaf rust fungus, Puccinia triticina, infection structures enriched for haustoria. Proteomics 11:944-63.

Szabo LJ, Kolmer JA (2007) Development of simple sequence repeat markers for the plant pathogenic rust fungus Puccinia triticina. Molecular Ecology Notes 01686: 708-710

Von Heijne G (1990) The signal Teptide. Curr Topics in Membrances and Transport 115:195-201.

Archive of SID

www.SID.ir