

بررسی مولکولی و آنالیز فیلوژنتیکی ژنهای ترانسپوزاز موجود در فیتوپلازماها

مجید صیام پور^۱ و محمد زکی عقل^۲

^۱ دانشگاه شهرکرد- دانشکده کشاورزی- گروه گیاهپزشکی

^۲ دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی- گروه گیاهپزشکی

Siampour.majee@agr.sku.ac.ir

خلاصه:

فیتوپلازماها شامل یک گروه از بیماری‌گرهای گیاهی از کلاس مالیکوتها هستند که در طبیعت توسط حشرات ناقل منتقل میشوند. ژنوم کوچک این میکروارگانیسمها شامل ژنهای مختلف و از جمله ژنهای ترانسپوزاز مربوط به عناصر ژنتیکی متحرک به نام Insertion sequence (IS) است. در این مطالعه ژنهای ۲۲ ترانسپوزاز شناسایی شده در ۷ فیتوپلازما بررسی و رابطه فیلوژنتیکی آنها مشخص شد. همه ژنهای مذکور در فیتوپلازماهای مطالعه شده متعلق به خانواده IS3 بوده و از نظر ژنتیکی تنوع قابل توجهی را نشان دادند. نتایج این بررسی نشان داد که ژنهای ترانسپوزاز فیتوپلازمایی در دو کلاستر کاملا متفاوت قرار میگیرند. همچنین مشخص شد که ژنهای مذکور در فیتوپلازماها شامل یک گروه تک نیایی نبوده بطوریکه شباهت یکی از کلاسترهای فیتوپلازمایی به گروهی از باکتریها بیشتر از قرابت به کلاستر دوم بود. وجود انتقال افقی ژن بین فیتوپلازماها برای گسترش ژنهای ترانسپوزاز بین فیتوپلازماها قابل تصور است. همچنین نتایج این تحقیق نشان میدهد که ژنهای ترانسپوزاز فیتوپلازماها به ژنهای مربوط به یکی از زیرگروههای خانواده IS3 به نام IS150 قرابت نزدیکی دارند هر چند که پیشنهاد میشود ژنهای ترانسپوزاز فیتوپلازمایی به عنوان گروه یا زیر خانواده جدید معرفی شوند.

کلمات کلیدی: فیتوپلازما، ترانسپوزاز، فیلوژنتیک

Molecular and phylogenetic analysis of Phytoplasma transposase genes

Majid Siampour¹ and Mohammad Zakiaghi²

¹Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

²Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

Siampour.majee@agr.sku.ac.ir

Siampour.majee@agr.sku.ac.ir

Abstract

Phytoplasmas are a monophylogenetic group belonging to wall-less prokaryotes in the class Mollicutes. Genome investigations revealed that phytoplasmas include Tra5 genes related to IS3 family of insertion sequences. Analysis also showed that these genes (23 genes analyzed in this study) are highly diverged, thus could be classified in at least two different phylogenetic clades. Phylogenetic analysis suggested that Phytoplasma tra5 genes do not compose a monophylogenetic group. Despite high variability, all phytoplasma Tra5 genes were closer to IS150 subgroup of IS3 family. Horizontal gene transfer could be evoked to explain the distribution of different copies of tra5 genes belonging to same phytoplasma throughout the phylogenetic tree. Results of this study also suggest that tra5 genes of phytoplasmas are distinguishable from the other members of IS3 family of insertion sequences to represent a new subgroup in this family.

Keywords: Phytoplasma, transposase, phylogenetic

مقدمه:

عناصر ژنتیکی معروف به Insertion sequence (IS) ترادفهای متحرک با اندازه هایی معمولاً کوچک (معمولاً کمتر از ۳ کیلو جفت باز) هستند که در ژنوم موجودات و ارگانیسمهای زنده مختلف یافت شده اند. عناصر IS کد کننده ژن ترانسپوزاز (Transposase) بوده که از مشخصات و خصوصیات آن برای طبقه بندی این عناصر به خانواده های مختلف استفاده شده است (۳). تا کنون بیش از ۳۰۰۰ گونه از این عناصر در باکتریها یافت شده اند که در ۲۰ خانواده مخالف طبقه بندی شده اند. (۴). در این میان مشخص شده که ژنوم فیتوپلاسمها نیز دارای ژن ترانسپوزاز بوده و بنابراین دارای عناصر ژنتیکی شبه IS است (۱).

فیتوپلاسمها شامل یک گروه مونوفیلوژنتیک از پاتوژهای گیاهی و متعلق به رده مالیکوتها هستند. این میکروارگانیسمها علاوه بر بافت ابکشی گیاهان در حشرات راسته Hemiptera تکثیر و بوسیله آنها بین میزبانهای گیاهی انتقال می یابند (۵). تاکنون ترادف ژنوم چند گونه از این فیتوپلاسمها بطور کامل مشخص و خصوصیات ژنتیکی آنها تا حدودی تعیین شده است. بررسیهای و آنالیزهای مولکولی مشخص کرده که ژنوم فیتوپلاسمها حامل ژنهای ترانسپوزاز (Tra5) است که از نظر شباهت متعلق به خانواده IS3 هستند. آنالیز ژنوم برخی از جدایه های مربوط به گونه *Ca. P. asteris* نشان از وجود کپی های متعدد از ژن Tra5 در ژنوم این فیتوپلاسمها داشت. از طرف دیگر ژنوم *Ca. P. mali* تنها حامل یک کپی از ژنهای Tra5 بوده است (۱ و ۲).

در این مطالعه ارتباط فیلوژنتیک ژنهای Tra5 فیتوپلاسمهای مختلف با هم و نیز با ژنهای مختلف متعلق به خانواده IS3 (شناسایی شده در پروکاریوتهای دیگر) بررسی شد. هدف این مطالعه مشخص کردن این موضوع است که آیا همه این عناصر ویژه ژنتیکی در فیتوپلاسمها از یک نیای واحد بوجود آمده اند یا روند تکاملی متفاوتی را طی کرده اند.

مواد و روشها:

ترادفهای مربوط به ژن Tra5 (کد کننده ژن Transposase) شناسایی شده در فیتوپلاسمهای مختلف از پایگاه اطلاعاتی NCBI گرد آوری شد. ترادفهای مذکور بوسیله برنامه IS Finder (<https://www-is.biotoul.fr>) آنالیز و جایگاه آنها در سطح خانواده (IS family) مشخص شد. با استفاده از برنامه BLASTP ترادفهای غیر فیتوپلاسمایی نزدیک به این ژنها شناسایی و از بانک ژن استخراج شدند (با شباهت حداقل ۳۰ درصدی به یکی از ژنهای Tra5 فیتوپلاسمایی). همچنین ژنهای Tra5 متعلق به خانواده IS3 که به عنوان ژنهای نماینده این خانواده مطرح بودند از بانک ژن بدست آمدند (<https://www-isbiotol.fr>).

ترادف آمینواسیدی ژنهای Tra5 بوسیله برنامه ClustalW هم ردیف سازی (Align) و برای ترسیم درخت فیلوژنتیکی در برنامه Mega 4 مورد استفاده قرار گرفت. درخت فیلوژنتیکی بروش Neighbor joining ترسیم و اعتبار شاخه های بدست آمده با آزمون boot strap و براساس ۱۰۰۰ تکرار مشخص شد.

نتایج و بحث:

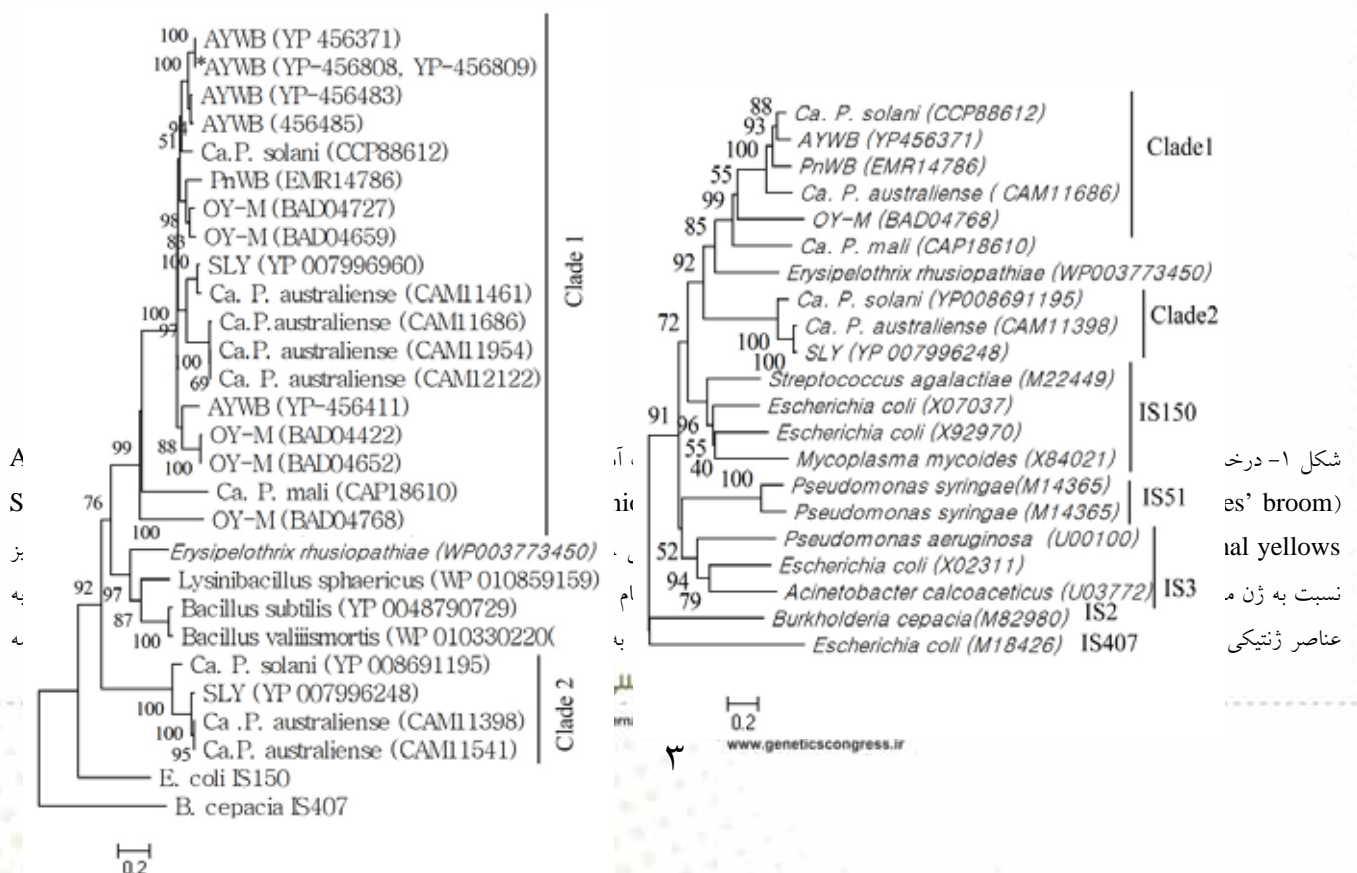
در این مطالعه ۲۲ ژن ترانسپوزاز (Tra5) مربوط به ۷ فیتوپلاسم از بانک ژن استخراج شد. ژنهای مذکور دارای تعداد متنوعی آمینواسید بین ۱۴۰ (SLY, YP007997044) تا ۳۹۰ آمینواسید (*Ca. P. australiense*, CAM11398) بودند. از نظر شباهت در ترادف نیز مشخص شد که ژنهای Tra5 در فیتوپلاسمها دارای تنوع قابل توجه بوده و شباهت آنها در سطح آمینواسیدی بین ۳۲ تا صد درصد بود. نتایج بررسی با برنامه IS Finder با روش BLASTP نشان داد که همه ژنهای مذکور دارای بیشترین شباهت با ژنهای ترانسپوزاز متعلق به خانواده IS3 هستند. خانواده مذکور از نظر فیلوژنتیکی دارای چند زیرگروه یا زیرخانواده است که همگی دارای مشخصاتی مشترک از

جمله وجود برخی موتیفهای ویژه هستند. موتیف DDE یکی از این موتیفهاست که وجود آن به صورت حفاظت شده در ژنهای Tra5 فیتوپلاسمهای آنالیز شده مشخص شد. Lee و همکاران (۱) نیز موتیف مذکور را در ژن Tra5 چند فیتوپلاسمای مربوط به *Candidatus phytoplasma asteris* (Ca. P. asteris) تأیید کردند. آنالیزهای انجام شده در این بررسی مشخص کرد که همه ژنهای Tra5 فیتوپلاسمای علیرغم تنوع زیاد دارای مشخصات مشابهی بوده و همگی به خانواده IS3 تعلق دارند. آنالیز BLASTP از طریق برنامه IS Finder نشان داد که از بین زیرخانواده های موجود در خانواده IS3، زیرخانواده IS150 نزدیکترین گروه به ژنهای Tra5 یافت شده در فیتوپلاسمهاست. سایر گروههای این خانواده از جمله IS407 شباهت (identity) کمتری به ژنهای Tra5 فیتوپلاسمایی داشتند.

درخت فیلوژنتیکی حاصل از آنالیز ژنهای Tra5 فیتوپلاسمایی و غیر فیتوپلاسمایی در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج آنالیز فیلوژنتیکی نشان میدهد که ژنهای Tra5 فیتوپلاسمایی حداقل در دو کلاستر قابل تقسیم بندی هستند. از این بین کلاستر ۱ شامل ژنهای متنوع تر بوده و از این رو میتواند به گروههای بیشتری تفکیک شود. بررسیها همچنین نشان داد که ترادفهای Tra5 موجود در فیتوپلاسمها یک گروه تک نیایی (mono-phylogenetic) را تشکیل نمی دهند بطوریکه فیتوپلاسمهای موجود در کلاستر ۱ ارتباط فیلوژنتیکی نزدیکتری با ترادفهای IS موجود در چند باکتری دیگر نشان دادند. کلاستر ۲ شامل یک گروه از فیتوپلاسمهاست که بطور مستقل در یک گروه فیلوژنتیکی مجزا طبقه بندی شدند (strap boot ۱۰۰ درصد، شکل A-۲). نتایج این بررسی نشان میدهد که ژنوم فیتوپلاسمها میزبان دو گروه متفاوت از ژنهای Tra5 است.

A

B



درخت قرار گرفته است. #: ترانسپوزاز از دو ژن متوالی A و B تشکیل شده است. شکل B: ارتباط فیلوژنتیکی نزدیکتر ژن ترانسپوزاز فیتوپلاسمای نماینده از دو کلاستر ۱ و ۲ (Clade 1 و Clade 2) با اعضای زبر خانواده IS150 (از بین ۵ زیرخانواده مطرح در خانواده IS3). شماره های داخل پرانتز نشاندهنده شماره دسترسی به ترادفهای مذکور در بانک ژن است.

Fig.1. Transposase (Tra5)- based Neighbor-Joining Phylogenetic tree to show phylogenetic relationship among 7 phytoplasma isolates and also between phytoplasmas and other bacteria. A: the representative phylogenetic tree showing that Tra5 gene of phytoplasmas are divided into 2 major clades 1 and 2. As shown clade 1 is phylogenetically closer to Tra5 genes in some other bacterial species. B: The phylogenetic relationship between phytoplasma representative transposase genes from 2 clades 1 and 2 and representative transposase genes from different IS subgroups belonging to IS3 family.

نکته قابل توجه در ارتباط با فیلوژنی ژن Tra5 فیتوپلاسمها آن است که ژنهای مختلف موجود در یک فیتوپلاسم لزوماً با یکدیگر در یک گروه فیلوژنتیکی قرار نمی گیرند. به عنوان مثال ژنهای Tra5 متعلق به فیتوپلاسمای (Onion yellows OY-M) در قسمتهای مختلف کلاستر ۱ قرار گرفته و با ژنهای همتای خود در فیتوپلاسمهای PnWB و AYWB ارتباط فیلوژنتیکی نزدیکی نشان داد. کپی های ژن Tra5 در فیتوپلاسمهای Ca. P. australiense و SLY در دو کلاستر متفاوت (کلاسترهای ۱ و ۲) قرار گرفتند. در یک مطالعه نیز مشخص شده است که فیتوپلاسمای جاروک لیموترش (Lime witches' broom) احتمالاً دارای دو کپی متفاوت از ژنهای Tra5 بوده که از نظر فیلوژنتیکی با ژنهای همتای خود در فیتوپلاسمهای متفاوت گروه بندی میشوند (صیام پور و همکاران- اطلاعات منتشر نشده). نتایج مطالعه مذکور انتقال افقی ژن را بین فیتوپلاسمها را به عنوان یکی از مکانیزمهای برای توضیح این مشاهدات مطرح میکند (صیام پور و همکاران- اطلاعات منتشر نشده).

در این بررسی همچنین ارتباط فیلوژنتیکی ژنهای Tra5 فیتوپلاسمها با ژنهای نماینده خانواده IS3 مشخص شد. در این ارتباط ژنهای ترانسپوزاز تمایز زیرگروههای متفاوت در خانواده IS3 و ژنهای Tra5 نماینده فیتوپلاسمها بررسی شدند. آنالیز فیلوژنتیکی مشخص کرد که همه ژنهای Tra5 فیتوپلاسمایی دارای ارتباط فیلوژنتیکی نزدیکتری با زیرگروه Is150 بوده و با اعضای این زیر گروه در یک کلاستر قرار گرفتند (boot strap ۷۲ درصد، شکل B-۲). در درخت فیلوژنتیکی مذکور، مجدداً ایجاد دو کلاستر متفاوت فیتوپلاسمایی و ارتباط نزدیکتری یکی از این زیرگروهها به گروه غیر فیتوپلاسمایی بدست آمد. همچنین الگوی (Topology) درخت فیلوژنتیک ایجاد شده با روش Neighbor joining با الگوی درخت فیلوژنتیکی به روش Maximum parsimony مشابه بود (اطلاعات نشان داده نشده است). این نتایج نشان می دهد که ژنهای Tra5 فیتوپلاسمایی علیرغم تنوع قابل توجه همگی دارای ارتباط نزدیکتری با زیرگروه IS150 هستند. نتیجه این آنالیزهای فیلوژنتیک با بررسیهای انجام شده با BLASTP مطابق بود.

علیرغم اینکه ژنهای Tra5 فیتوپلاسمایی به عنوان اعضای خانواده IS3 مطرح هستند ولی تفاوتی ساختاری قابل توجهی نیز بین این دو گروه مشاهده شده است. به عنوان مثال ژنهای ترانسپوزاز موجود در ترادفهای مربوط به خانواده IS3 شامل دو چارچوب ژنی A و B هستند که برای بیان چارچوب کامل (ORF AB) نیاز به مکانیزم frameshift دارند. با این حال ژنهای Tra5 فیتوپلاسمایی غالباً دارای یک چارچوب ژنی واحد بوده و از این رو نیاز به مکانیزم frameshift برای ترجمه ندارند (۱ و ۲). در این موارد یک ترادف تنظیمی در بالادست این ژنها گزارش شده است که میزان بیان این ژنها را کنترل میکند (۲). در مواردی نیز ژن Tra5 فیتوپلاسمایی شامل دو چارچوب ژنی A و B بوده ولی در این موارد ترادف تنظیمی بالا دست ردیابی نشده است (صیام پور و همکاران- منتشر نشده). همچنین ترادفهای Inverted repeat در دو انتهای ژنهای Tra5 فیتوپلاسمایی بمانند سایر اعضای خانواده IS3 مشاهده نشده است (۱). مجموع این مقایسات ترادفهای فیتوپلاسمایی مذکور را به عنوان یک یا دو گروه مستقل و در خانواده IS3 پیشنهاد میکند.

بطور کلی نتیجه این بررسی وقوع ژنها و ترادفهای متنوع و متعدد مربوط به ژن Tra5 را در ژنوم فیتوپلاسمها نشان میدهد. این ترادفها به طریقه انتقال افقی توانسته اند ژنوم فیتوپلاسمهای مختلف را تحت تاثیر قرار داده و در قسمتهایی از ژنوم آنها قرار گیرند. مطالعه این ژنها از جهات مختلف از جمله تاثیر روی سازمان ژنوم فیتوپلاسمها میتواند اهمیت این ژنها را در مورد این میکروارگانیسمها بیشتر آشکار سازد.

References:

1. Hogenhout, S., Oshima, K., Ammar, E. D., Kakizawa, S., Kingdom, H. & Namba S. (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*. 9 (4): 403–423.
2. Lee, I. M., Zhao, Y. & Bottner, K. D (2005). Novel insertion sequence-like elements in phytoplasma strains of the aster yellows group are putative new members of the IS3 family. *FEMS Microbiology Letters*. 242 (2): 353-
3. Mahillon, J. & Chandler, M. (1998). Insertion Sequences. *Microbiol. Molecular Biology Review*. 62: 725–774.
4. Wagner, A., Lewis, C. & Bichsel M. (2007). A survey of bacterial insertion sequences using IScan. *Nucleic Acids Research*. 35 (16): 5284-5293.
5. Weintraub, P.G. & Beanland, L. (2006). Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*. 51: 91–111.