



Isolation of Candidate Genes in Host- *Phelipanche aegyptiaca* Interaction by Genome Walking

M.R. Rezaei¹, A. Mirshamsi Kakhki^{2*}, A.R. Seifi³

Received: 10-08-2021

Revised: 27-11-2021

Accepted: 09-04-2022

Available Online: 21-09-2022

How to cite this article:Rezaei, M.R., Mirshamsi Kakhki, A., & Seifi, A.R. (2022). Isolation of Candidate Genes in Host- *Phelipanche aegyptiaca* Interaction by Genome Walking fields. *Journal of Iranian Plant Protection Research* 36(2): 259-267. (In Persian with English abstract)DOI: [10.22067/JPP.2022.71531.1038](https://doi.org/10.22067/JPP.2022.71531.1038)

Introduction

Broomrape (*Phelipanche aegyptiaca*) is one of the most important plant parasitic species which causes significant yield loss of different crops by colonizing roots and uptaking nutrients from the host plants. Haustoria attachment stage is the most important stage to study molecular mechanism of plant-parasite interaction. Identifying key genes in haustoria attachment stage may reveal novel strategies to control Broomrape. Transcriptome studies by Next-generation (high throughput, deep) sequencing have become an important tool in the molecular biology of plants in recent years. All stage-specific RNA-seq data are available on the plant parasite genome project database (<http://ppgp.huck.psu.edu>). Differential gene expression in haustoria attachment stage can detect candidate parasitism genes and contribute to understanding molecular basis of plant-parasite interaction. This information may reveal novel genetic strategies such as HIGS to control *Phelipanche aegyptiaca* efficiently.

Materials and Methods

Analysis of Transcriptome data from the plant parasite genome project database (<http://ppgp.huck.psu.edu>) at Haustoria attachment stage and imbibed seed stage revealed 391 gene transcripts with differential expression in these stages (unpublished data). Among these transcripts, four transcripts with unknown functions were detected with a high fold change in expression in the haustoria attachment stage. In order to predict possible roles of these transcripts in broomrape-host interactions, we used genome walking method to extend these transcripts. DNA was extracted from *Phelipanche aegyptiaca* stem using CTAB method. The quantity and quality of DNA samples were determined using the NanoDrop and agarose gel electrophoresis. DNA was digested by four restriction enzymes, *DraI*, *EcoRV*, *StuI*, *PvuII*. Four DNA libraries were purified using SDS protocol and ligated to GenomeWalker Adaptor (GenomeWalker Adaptor 1 and GenomeWalker Adaptor 2). Gene specific primers (GSPs) were designed using Primer3plus for Oa548, Oa3391, Oa1635, Oa424 transcripts. Primary PCR was done using gene-specific primer 1 (GSP1) and adaptor primer 1 (AP1). 1 µl of each primary PCR were diluted into 49 µl of deionized water. Diluted primary PCR products were used as template for Secondary PCR. Primary PCR was done to amplify the unknown sequence using gene-specific primer 2 (GSP2) and adaptor primer 2 (AP2). Secondary PCRs desired bands were extracted from agarose gel using Genet Bio k-8000 kit. Extracted products were ligated to pTG19-T vector. Recombinant vectors were cloned to *Escherichia coli* competent cells using heat shock procedure and then cultured on LB plates. Colonies that contain recombinant vectors were detected using blue-white screening. Colony PCR was done to confirm the presence of inserted sequences. Selected colonies were incubated in 37°C in LB media containing 100 microgram per ml Ampicillin. Plasmid extraction was done by Silica procedure. After sequencing by M13F and M13R, complete sequences were assembled using CAP contig assembly software. Fgenesh online software was used to predict gene structure by selecting *Arabidopsis thaliana* as organism. Gene prediction was done by AUGUSTUS. Complete sequences were more analyzed using Blast, CDD, Phobius prediction, HMMER, InterProScan.

1, 2 and 3- M.Sc. Student and Assistant Professors, Biotechnology and Plant Breeding Department, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: mirshamsi@um.ac.ir)

Results and Discussion

In this study we successfully extended the genomic sequences for two candidate transcript that showed increase expression in attachment stage. The sequence of Oa1635 and Oa424 transcripts was extended from the end of the 5' using the genome-walking method to determining the DNA sequence of unknown flank *genomic* regions and study the role of these sequences in plant-parasite interaction. Using this technique, 587bp and 165bp of new DNA sequences were obtained for Oa424 and Oa163, respectively. Analysis of homology using BLASTX algorithm for Oa424 showed 71.57% similarity (e-value: 2e-41) with unknown protein (XP_011081407.1) containing the transposase domain. Also, the results of CDD tool predicted the DDE_Tnp_ISL3 domain in position between 257 and 466 bp (e-value: 7.31e-14). For Oa1635 transcript, the results of homology analysis using BLASTX algorithm showed 72.73% (2e-9) similarity with retrovirus-related polyprotein sequence from transposon tnt 1-94 (GFP84907.1). As the regulatory function of proteins with mutant-like transposase domains, the two transcripts Oa424 and Oa1635 may play a key role in haustoria development and plant-parasitic interaction. Signal peptides have observed in these sequences suggesting that these transcripts encodes secretory proteins from haustoria to plant-parasite interaction.

Conclusion

Bioinformatics analysis on extended sequence, identified transposase domains which may have regularity role in parasitic process such as haustoria development or penetration. These genes may play important roles in plant-parasite interaction and developing molecular strategies to control this parasitic plant.

Keywords: Genome walking, Plant parasite, Transcriptome

مقاله پژوهشی

جلد ۳۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱، ص. ۲۶۷-۲۵۹

جداسازی ژن‌های کاندید در میانکنش میزبان - گل جالیز (*Phelipanche aegyptiaca*) با استفاده از روش پیمایش ژنوم

محمد رضا رضائی^۱ - امین میرشمسی کاخکی^{۲*} - علیرضا سیفی^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۰

چکیده

گیاه گل جالیز مصری (*P. aegyptiaca*) یکی از مهمترین گونه‌های انگلی می‌باشد که خسارت پنهان آن به انواع گیاهان زراعی از طریق جذب آب و مواد غذایی از ریشه گیاه میزبان، بسیار قابل توجه است. مرحله اتصال مکینه انگل به میزبان، مهم‌ترین مرحله برای مطالعه مولکولی میانکنش انگل-میزبان است. با گسترش روش‌های توالی‌یابی NGS و مطالعات ترنسکریپتوم، اطلاعات مهمی از مراحل رشدی و میانکنش گیاهان انگلی با میزبان در دسترس قرار گرفته است. برای روشن شدن راهبردهای مولکولی کلیدی این فرایند، داده‌های RNA-Seq موجود در پایگاه داده پروژه ژنوم گیاهان انگلی (<http://ppgp.huck.psu.edu>) آنالیز شد. آنالیز داده‌های ترنسکریپتوم مربوط به مرحله اتصال به میزبان به عنوان مرحله مهم در فرایند انگلی شدن، منجر به شناسایی رونوشت‌هایی با افزایش بیان در این مرحله گردیده است. از بین رونوشت‌های شناسایی شده احتمالی با کارکرد نامشخص، چهار رونوشت که بیشترین سطح بیان را در مرحله اتصال به میزبان داشتند در این مطالعه بطور دقیق‌تری بررسی شدند. برای تشخیص نقش احتمالی این رونوشت‌ها در فرایند انگلی شدن گل جالیز، جهت دستیابی به توالی کامل‌تر از روش پیمایش ژنوم استفاده شد. ۵۸۷ جفت باز به توالی رونوشت Oa424 و ۱۶۵ جفت باز به توالی رونوشت Oa1635 اضافه گردید. بررسی‌ها نشان داد توالی کامل رونوشت Oa424 و بخشی از توالی Oa1635 به روش پیمایش ژنوم جداسازی شده است. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالی‌های کامل Oa424 و Oa1635، تشابه با پروتئین‌های با فعالیت ترانسپوزاز را نشان دادند. با توجه به نقش تنظیمی پروتئین‌های دارای دامین ترانسپوزاز به نظر می‌رسد احتمالاً این دو رونوشت نقش تنظیمی در فرایند انگلی شدن دارند. همچنین با توجه به وجود سیگنال پپتید در این توالی‌ها، احتمالاً این دو رونوشت پروتئین‌های ترشحی را کد می‌کنند که در میانکنش انگل-میزبان از اندام مکنده ترشح می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: پیمایش ژنوم، ترنسکریپتوم، گیاه انگل

مقدمه

اقتصادی به گیاهان خانواده‌های Apiaceae، Cruciferae، Solanaceae، Cucurbitaceae، Leguminosae، Compositae، و Geraminaceae شده است (Chai et al., 2015).

در این بین، گل جالیز مصری (*Phelipanche aegyptiaca*) یکی از مهمترین گونه‌های گل جالیز می‌باشد که خسارت پنهان آن به انواع گیاهان زراعی، بسیار قابل توجه است. چرخه‌ی زندگی این انگل یک سال طول می‌کشد و در پایان این دوره قادر است بذور ریز و فراوانی را تولید کند، که تا ۲۰ سال قوه‌ی نامیه‌ی خود را در خاک حفظ می‌کند (Singh et al., 2006). این انگل اکثر دوره‌ی زندگی خود را در زیر خاک گذرانده و استقرار موفق در خاک، آن را تبدیل به یک مخزن برای دریافت آب و مواد غذایی از گیاه میزبان می‌کند

گونه‌های گل جالیز (*Orobanchae spp.*)، گونه‌های انگلی هستند که آب، مواد معدنی و آلی مورد نیاز خود را از طریق مکینه‌ی انگلی از گیاه میزبان دریافت می‌کنند. این گیاه نوعی علف هرز انگل اجباری است که در سرتاسر منطقه مدیترانه، آسیای غربی و اروپای شرقی، باعث بروز خسارت فراوانی شده است. این گیاه باعث خسارت عمده

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیاران، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

(Email: mirshamsi@um.ac.ir)

*- نویسنده مسئول:

DOI: 10.22067/JPP.2022.71531.1038

مقدماتی مطالعات RNA-Seq و با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی به عنوان هدف پروژه مورد بررسی قرار گرفت. اخیراً از روش خاموشی ژن از طریق میزبان (HIGS^۲) به عنوان یک روش موثر در کنترل آفات و بیماری‌ها در روش‌های مهندسی ژنتیک استفاده می‌شود (Koch and Govindarajulu et al., 2015). روش HIGS در پژوهش‌هایی که برای کنترل گیاهان انگلی مانند *Striga asiatica* (Yoder et al., 2009)، *Triphysaria versicolor* (Tomilov et al., 2008) و *Cuscuta pentagona* (Alakonya et al., 2012) انجام شده‌اند، مورد استفاده قرار گرفته است. پس از جداسازی با استفاده از روش پیمایش ژنوم (Leoni et al., 2011) و بررسی بیوانفورماتیکی، ژن‌های کلیدی جهت استفاده در طراحی استراتژی‌های مبتنی بر HIGS، مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

مواد و روش‌ها

شناسایی رونوشت‌های کاندید با نقش نامشخص در میانکنش

در این مطالعه، داده‌های توالی یابی ترنسکرپتوم گل جالیز مربوط به پایگاه PPGP (<http://ppgp.huck.psu.edu>) گونه *P. aegyptiaca* در مرحله جوانه‌زنی و اتصال به میزبان مورد تجزیه و تحلیل تفاوت بیان قرار گرفت. در این بررسی چهار رونوشت با نقش نامشخص Oa548، Oa3391، Oa1635 و Oa424 از بین رونوشت‌های افزایش بیان یافته در مرحله اتصال به میزبان (جدول ۱)، بر اساس بیشترین بیان (Fold Change) و کمترین P-value، انتخاب گردید (داده‌های چاپ نشده).

جدول ۱- رونوشت‌های انتخابی با نقش نامشخص

Table 1- Selected transcripts with unknown function

نام رونوشت انتخابی	تفاوت بیان	مقدار پی
Transcript Name	Fold change	P-value
Oa548	6253	1.59E-09
Oa3391	2108	2.00E-07
Oa1635	1890	6.88E-08
Oa424	681	9.90E-07

جداسازی ژن‌های کاندید با استفاده از روش پیمایش ژنوم

استخراج DNA و تهیه کتابخانه‌های پیمایش ژنوم

استخراج DNA از ساقه گل جالیز رشدیافته در مزرعه گوجه‌فرنگی به روش CTAB براساس روش دوویل (Doyle, 1991)

(Delavault, 2015). انگل در مراحل پایانی نمو، در حالی که ارتباط بسیار نزدیک و شدیدی با ریشه‌ی گیاه میزبان برقرار کرده است، با ظهور قسمت گل‌دار، بیرون از خاک پدیدار می‌گردد. گل‌جالیز به موجب جذب آب، مواد معدنی و برخی ماکرومولکول‌ها از میزبان، خسارت ظاهری مانند پژمردگی، کوتولگی، و در نهایت کاهش کیفی و کمی محصول را به دنبال دارد (Joel et al., 2007).

نحوه‌ی استقرار گل‌جالیز بر روی ریشه‌ی گیاه میزبان و اعمال عمده‌ی خسارت قبل از ظهور ساقه‌ی گل‌دهنده، کنترل این انگل را بسیار مشکل ساخته است. تاکنون بسیاری از راهبردهای کنترل، همچون روش‌های گوناگون به‌زرعی تا کنترل شیمیایی انجام شده (Joel et al., 2007)، که متأسفانه هیچ‌کدام از روش‌های کنترل موجود روشی موثر، مقرون به صرفه و قابل اجرا در سطح مزرعه نبوده است. به رغم تلاش‌های گسترده‌ای که در جهت کنترل گل‌جالیز صورت گرفته، به دلیل ارتباط نزدیک میزبان و انگل، سیکل زندگی و ظهور آن بعد از اعمال خسارت، نتایج موفقیت آمیز کمی حاصل شده است (Gressel et al., 2004). از این‌رو لزوم توسعه و معرفی روش‌های جایگزین، با بهره‌وری بالا، از طریق مطالعه دقیق میانکنش انگل-میزبان جهت شناخت راهبردهای درگیر و استفاده از مهندسی ژنتیک برای ایجاد مقاومت در گیاهان زراعی ضروری به نظر می‌رسد. اخیراً با گسترش روش‌های توالی‌یابی NGS^۱، مطالعات ترنسکرپتومی به یکی از ابزارهای مهم تحقیقات ژنتیکی تبدیل شده است. با استفاده از مطالعات ترنسکرپتوم اطلاعات مفیدی از هر یک از مراحل رشدی به دست می‌آید (Wang et al., 2009). مطالعه ترنسکرپتوم گل جالیز در سال ۲۰۱۴ صورت گرفت و داده‌های ترنسکرپتوم تمام مراحل رشدی گل جالیز از طریق پایگاه داده پروژه ژنوم گیاهان انگلی (<http://ppgp.huck.psu.edu>) در دسترس است (Yang et al., 2014). یکی از مهمترین عوامل موفقیت در کنترل جوامع انگلی، انتخاب ژن‌های ضروری و دخیل در مراحل ابتدایی رشد و نمو انگل است، که به منظور کنترل انگل قبل از اعمال خسارت بسیار حائز اهمیت است (Yoder et al., 2009). آنالیز مقدماتی انجام شده توسط تیم تحقیقاتی حاضر روی داده‌های ترنسکرپتوم مربوط به مرحله اتصال به میزبان به عنوان مرحله مهم در فرایند انگلی شدن، منجر به شناسایی رونوشت‌هایی با افزایش بیان در این مرحله گردیده است (داده‌های منتشر نشده). از بین رونوشت‌های شناسایی شده، چهار رونوشت با کارکرد نامشخص و همراه با بیشترین سطح بیان انتخاب شد.

به منظور بررسی *In silico* عملکرد احتمالی این ژن‌ها در فرایند میانکنش انگل-میزبان، در این تحقیق جداسازی توالی کامل برخی از این ژن‌های احتمالی کلیدی براساس داده‌های بدست آمده از فاز

به سلول مستعد انتقال یافت (Sambrook and Russell, 2006). جهت انتخاب تک کلون حاوی پلاسمید نوترکیب از روش غربالگری سفید/آبی و کلونی PCR برای شناسایی کلون‌های نوترکیب دارای قطعه مدنظر استفاده شد. پس از تایید حضور قطعه موردنظر از طریق روش کلونی PCR، کلونی باکتری در LB مایع حاوی آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رشد داده شد. سپس استخراج پلاسمید به روش سیلیکا انجام گرفت (Grimm, and Voß-Neudecker, 2003) انجام گرفت.

توالی‌یابی، آنالیزهای بیوانفورماتیکی و پیش‌بینی کارکرد ژن

پلاسمیدهای استخراج شده جهت انجام توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال و با استفاده از آغازگرهای M13F و M13R مورد توالی‌یابی قرار گرفت. سرهم کردن توالی کامل با استفاده از ابزار CAP contig assembly انجام شد. سپس ساختار ژنی توالی‌های کامل، با استفاده از ابزار Fgenesh به دست آمدند. در بخش انتخاب ارگانسیم ابزار Fgenesh، گزینه *Arabidopsis thaliana (thale cress)* انتخاب گردید. پیش‌بینی ژن با استفاده از ابزار AUGUSTUS برای توالی‌های کامل با انتخاب *Arabidopsis thaliana* به عنوان ارگانسیم انجام شد. از ابزارهای بیوانفورماتیکی CDD، Blast، HMMER، Phobius prediction و InterProScan برای بررسی توالی کامل به دست آمده، استفاده شد. تمام تنظیمات برای این ابزارها به صورت پیش‌فرض انجام شد.

نتایج و بحث

جداسازی ژن‌های کاندید با روش پیمایش ژنوم و سرهم

کردن توالی رونوشت‌های Oa424 و Oa1635

واکنش PCR اول برای ژن‌های کاندید موردنظر در ۴ کتابخانه ژنومی با استفاده از آغازگر آداپتور اول (AP1) و آغازگر اول اختصاصی ژن برای هر کدام از ژن‌های کاندید (جدول ۳) انجام شد. سپس واکنش PCR دوم همراه با آغازگر آداپتور AP2 و آغازگرهای اختصاصی ژن GSP2-424، GSP2-1635، GSP2-548 و GSP2-3391 انجام و منجر به تکثیر چندین باند قابل مشاهده برای هر رونوشت در هر کتابخانه ژنومی گردید (شکل ۱). بطور کلی در روش پیمایش ژنوم انتخاب باند با سایز بزرگتر که با شدت بالا و بصورت شارپ تکثیر شده باشد اولویت می‌باشد. برای مثال در مورد ژن Oa424 بزرگترین باند ضعیف تکثیر شده است لذا باند بسیار شارپ بعدی به عنوان قطعه تکثیر شده بصورت اختصاصی در نظر گرفته، تخلیص و جداسازی شد.

با کمی تغییرات انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز مورد سنجش قرار گرفت. جهت تهیه کتابخانه‌های پیمایش ژنوم، DNA ژنومی بعد از ارزیابی کیفی و کمی به طور کامل با آنزیم‌های محدود کننده *DraI*، *PvuII* و *EcoRV* (شرکت ThermoFisher)، برش داده شد. در نهایت هر کتابخانه با استفاده از تخلیص به روش SDS، تخلیص گردید (Leoni et al., 2011) و به طور جداگانه به آداپتورهای پیمایش ژنوم^۱ متصل شد. توالی این آداپتورها با نام‌های GenomeWalker Adaptor 1 و GenomeWalker Adaptor 2 در جدول ۲ آمده است.

مرحله جداسازی با استفاده از PCR های پیمایش ژنوم

طراحی آغازگرها در این مرحله با استفاده از ابزار Primer3Plus انجام شد (جدول ۲). برای هر رونوشت دو آغازگر اختصاصی طراحی شد. به این صورت که آغازگر دوم اختصاصی ژن (GSP2)^۲ در بالادست و آغازگر اول اختصاصی ژن (GSP1)^۳ نزدیک به انتهای ۵ پریم توالی قرار می‌گیرد. واکنش PCR به ازای هر کتابخانه با استفاده از آغازگر اول آداپتور (AP1) و یک آغازگر اول اختصاصی ژن (GSP1)، انجام شد. سپس مخلوط PCR اول ۱ به ۵۰ رقیق شده و به عنوان الگو برای PCR دوم با استفاده از آغازگر دوم آداپتور (AP2) و یک آغازگر دوم اختصاصی ژن (GSP2)، استفاده گردید. سپس محصولات PCR روی ژل آگارز الکتروفورز شدند. نتیجه این فرایند به طور کلی یک یا چند باند در هر محصول PCR در هر کتابخانه است.

تخلیص قطعات از ژل و کلونینگ قطعات PCR در وکتور TA

تخلیص باندهای مورد نظر از ژل با استفاده از کیت (Genet Bio k-8000) براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. سپس مقدار ۱۰۰ نانوگرم از هر کدام از قطعات تخلیص شده از ژل، در پلاسمید pTG19-T (۵۰ نانوگرم) مربوط به کیت TA (شرکت سیناکلون کد CL5841)، با استفاده از دستورالعمل شرکت سازنده کلون شدند. این پلاسمید دارای ژن *LacZ* برای غربالگری به روش کلونی‌های سفید/آبی و همچنین آغازگرهای M13 برای توالی‌یابی می‌باشد.

انتقال وکتور نوترکیب به باکتری مستعد

ابتدا سلول مستعد باکتری با استفاده از *Escherichia coli* سویه *Top10* تهیه و سپس پلاسمیدهای نوترکیب به روش شوک حرارتی

- 1- GenomeWalker Adaptors
- 2- Gene-specific primer 2
- 3- Gene-specific primer 1

جدول ۲- توالی‌های اولیگونوکلوئوتیدی، آغازگرهای اختصاصی (GSP) و آغازگرهای آداپتوری (AP) مورد استفاده در این مطالعه
Table 2- Oligonucleotide sequences, gene specific primers (GSP) and adaptor primers (AP) used in this study

نام آغازگر Primer name	دمای اتصال Tm° C	توالی پرایمر ۵' < ۳' Primer sequence 5' > 3'
548_GSP1	57	CCCATCAGTGGATCTTGCT
548_GSP2	56	CTAGTGGGATTGGATTTTGTATGCC
424_GSP1	56	AGCGCATATAGTAACGCATC
424_GSP2	58	CAACTCCTCCTTTGGCTGTCTC
1635_GSP1	58	AAAAGGGTCATGGTCTGGTG
1635_GSP2	55	GTTTTGGCTTTGATAAGGAGTGCT
3391_GSP1	56	ATCAAAAAGCCGGATGTGTTC
3391_GSP2	56	GCTGAGAAGCAAAGCCACAAAA
AP1	51	GTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	59	ACTATAGGGCACGCGTGGT
GenomeWalker Adaptor 1	-	CCCGACCA
GenomeWalker Adaptor 2	-	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGT

همچنین این آنالیز نشان داد که دو بخش CDSf و CDSI به ترتیب مربوط به توالی‌های کدکننده با کدون آغاز و کدون پایان به ترتیب در موقعیت (+172-82) و (+604-528) قابل شناسایی هستند. علاوه بر این پیش‌بینی ساختار ژن توالی Oa1635 نشان دهنده وجود سیگنال احتمالی TATA-Box و PolyA به ترتیب در موقعیت +174 و +831 می‌باشد (شکل ۲ و جدول ۳). بررسی همولوژی توالی کامل Oa424 با استفاده از الگوریتم BLASTX همانندی 71.57 درصدی (2e-41) با پروتئین ناشناخته (XP_011081407.1) حاوی دومین ترانسپوزاز را نشان داد. نتایج آنالیز همولوژی با استفاده از الگوریتم‌های BLASTX و BLASTN در جدول ۴ آورده شده است. همچنین آنالیز توالی کامل Oa424 توسط ابزار CDD مربوط به پایگاه NCBI، وجود دومین ترانسپوزازی DDE_Tnp_ISL3 بین فاصله 257 تا 466 جفت باز (7.31e-14) را تایید نمود. با استفاده از ابزار ORFfinder، بلندترین توالی ORF به دست آمد و سپس این توالی با ابزار HMMER مورد ارزیابی قرار گرفت. خروجی بدست آمده کاملاً نتایج آنالیز BLASTX و BLASTN را تایید نمود. نتایج آنالیز همولوژی با استفاده از الگوریتم BLASTX برای توالی Oa1635 همانندی 72.73 درصدی (2e-9) با توالی Retrovirus-related pol polyprotein from transposon tnt 1-94 با شماره دسترسی GFP84907.1 نشان داد (جدول ۴).

رونوشت‌های ناشناخته Oa424 و Oa1635، در مرحله اتصال انگل به میزبان در گیاه انگلی، افزایش بیان را نشان دادند. توالی کامل این رو نوشت‌ها از سمت انتهای ۵ پریم با استفاده از روش پیمایش ژنوم گسترش داده شد تا نقش این رونوشت‌ها در میانکنش انگل و

لازم به ذکر است در این موارد جداسازی و تخلیص این باندها نیز نتیجه بهتری می‌دهد. بطور کلی در پیمایش ژنوم تکثیر غیر اختصاصی معمول است و باندهای غیر اختصاصی به دلیل تکثیر کمتر در واکنش PCR روی ژل کم‌رنگ تر مشاهده می‌شوند. با توجه به نتایج حاصل، به ترتیب برای رونوشت‌های Oa424 باند حدوداً ۶۰۰ جفت بازی، رونوشت Oa1635 باند ۲۰۰ جفت بازی، رونوشت Oa548 باند حدوداً ۹۰۰ جفت بازی و رونوشت Oa3391 باند حدوداً ۷۰۰ جفت بازی انتخاب و بعد از تخلیص از ژل در وکتور pTG19T کلون شدند. بعد از انجام کلونی PCR، پلاسمیدهای تایید شده pTG19T-424 و pTG19T-1635 توالی‌یابی قرار گرفت. کلونی PCR برای دو رونوشت Oa548 و Oa3391 تایید نشد و برای توالی‌یابی ارسال نشدند.

سرهم کردن توالی کامل با استفاده از ابزار CAP contig assembly، همردیفی ۳۸ جفت باز از قطعه حاصل از پیمایش ژنوم را با قطعه رونوشت Oa424 تایید کرد. در این پیمایش ژنومی ۵۸۷ جفت باز به انتهای 5' توالی Oa424 اضافه گردید. همچنین ۲۲ جفت باز از قطعه حاصل از پیمایش ژنوم با توالی Oa1635 همردیف گردید و ۱۶۵ جفت باز به انتهای 5' توالی Oa1635 اضافه شد.

پیش‌بینی ساختار ژن و آنالیز انتولوژی توالی‌های کامل Oa1635 و Oa424

نتایج آنالیز توالی Oa424 با استفاده از ابزار Fgenesh، حضور سیگنال TSS^۱ مربوط به ناحیه TATA-box و سیگنال PolyA را در موقعیت‌های (+29 و +797) توالی پیش‌بینی نمود.

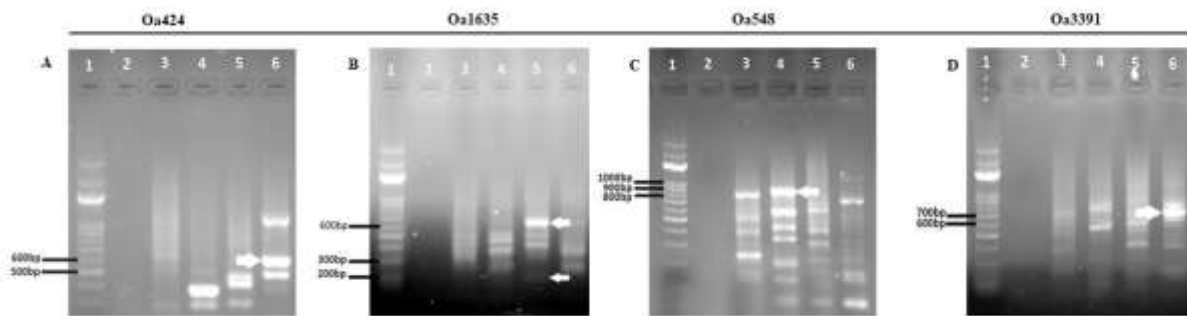
2- Coding DNA sequence

3- Coding DNA sequence _ internal

1- Position of transcription start (TATA-box position and score)

توالی کامل برای هر دو رونوشت، شامل ناحیه TATA-box، ناحیه CDS و سیگنال PolyA بودند.

Oa424 میزبان مشخص شود. در این روش، به انتهای 5' توالی های Oa424 و Oa1635، به ترتیب ۵۸۷ و ۱۶۵ جفت باز اضافه شدند. نتیجه آنالیز

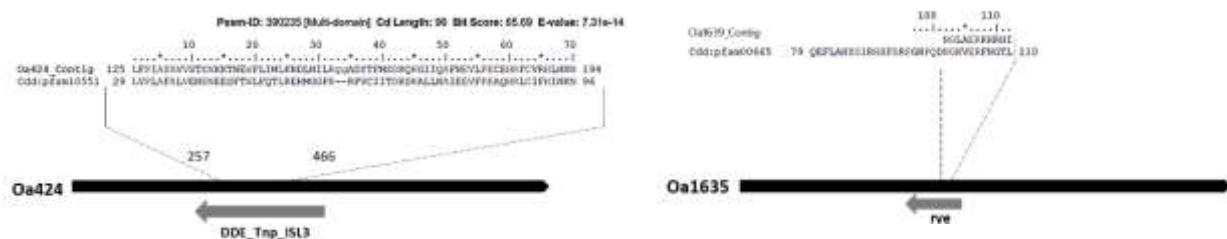


شکل ۱- تکثیر قطعات PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن 424-GSP2، 1635-GSP2، 548-GSP2 و 3391-GSP2 و آغازگر آداپتور AP2 و در PCR مرحله دوم پیمایش ژنومی

چاهک ۱ سایز مارکر 100bp (شرکت دنازیست)، چاهک ۲ کنترل منفی و چاهک ۳ تا ۶ به ترتیب مربوط به تکثیر ناحیه بالادست توالی چهار رونوشت کاندید

Figure 1- Amplification of PCR fragments using specific primers (424-GSP2, 1635-GSP2, 548-GSP2 and 3391-GSP2) and AP2 (nested primer) in the second PCR of genome walking

Lane 1, 100bp DNA ladder (Denazist); Lane 2, negative control, Lane 3-6, second PCR product amplified from the upstream region of the four candidate transcripts



شکل ۲- نمایش شماتیک همردیفی توالی و موقعیت آن در دومین‌های پیش بینی شده توسط ابزار CCD

Figure 2- Schematic representation of sequence alignment and its positions in predicted domains by CCD

جدول ۳- پیش‌بینی ساختار ژن و موقعیت سیگنال توالی‌های Oa1635 و Oa424 با استفاده از ابزار AUGUSTUS

Table 3- Prediction of gene structure and signals position of Oa424 and Oa1635 sequences by AUGUSTUS

نام توالی Sequence name	طول Length	ژن Gene	ترمینال Terminal	کدکننده CDS	کدون پایان Stop Codon	تی‌اس‌اس TSS	سیگنال پلی‌آ PolyA Signal
Oa1635	894	Begin	209	-	209	596	831
		End	598	-	598	598	
		Strand	+	+	+	+	
Oa424	839	Begin	88	-	88	602	797
		End	604	-	604	604	
		Strand	+	+	+	+	

DNA و دومین‌های فعال‌سازی رونویسی در ترانسپوزاز Mutator-like ها بسیار حفاظت شده است که احتمالاً نقش فعال‌سازی برخی

با بررسی همولوژی توالی کامل رونوشت Oa424، دامین ترانسپوزاز Mutator-like مشاهده گردید. دومین‌های اتصال به

سلول‌های میزبان و متیلاسیون DNA، پرموتر ژن *E-cadherin* (*CDH1*) را مورد هدف قرار داده و بیان آن را کاهش می‌دهد (Moon et al., 2012). با توجه به نتیجه BLASTX و BLASTN برای رونوشت Oa1635 (جدول ۴)، همولوژی با توالی Retrovirus-related pol polyprotein from transposon tnt 1-94 *Phtheirospermum japonicum* و خانواده Orobanchaceae می‌باشد و دارای نقش ترنسپوزازی می‌باشد. از آنجاکه نقش تنظیمی پروتئین‌های دارای دامین ترانسپوزاز Mutator-like مشخص شده است، احتمالاً دو رونوشت Oa1635 و Oa424 در فرایندهای انگلی نقش کلیدی دارند و احتمالاً دارای نقش تنظیمی می‌باشند. در توالی این دو رونوشت ناحیه سیگنال پپتید تشخیص داده شد. پس احتمالاً این دو پروتئین ترشحی می‌باشند و ممکن است در میانکشن گل‌جالیز و میزبان از طریق اندام مکنده ترشح شوند.

ژن‌ها را ایفا می‌کنند (Lin et al., 2007). برای مثال می‌توان به نقش آن‌ها در تنظیم بیوسنتز کلروفیل اشاره کرد (Tang et al., 2012). فقدان یا افزایش بیان ترانسپوزاز DAYSLEEPER در گیاهان آراییدوپسیس منجر به رشد و نمو غیرطبیعی در این گیاه می‌شود. یافته‌های این مطالعه نشان دادند که ترانسپوزازها می‌توانند برای توسعه گیاهی ضروری باشند و بیان ژن را در سطح کلان تنظیم کنند (Bundock and Hooykaas, 2005). رابطه تکاملی بین فاکتورهای رونویسی مخمر مانند *Rcs1p* و *Rbf1p* و ترانسپوزازها و همچنین رابطه تکاملی بین دامین فاکتور رونویسی WRKY-GCM1 و ترانسپوزازها اثبات شد (Aravind et al., 2006). متاسفانه در خصوص نقش ترانسپوزازها در میانکشن انگل-میزبان تا کنون گزارشی ارایه نشده است و تنها مقالات معدودی به نقش ترانسپوزازها در خصوص پاتوژن‌ها اشاره کرده‌اند. برای مثال، ترانسپوزاز باکتری *Acinetobacter baumannii* با عمل بر هسته

جدول ۴- آنالیز همولوژی توالی های Oa1635 و Oa424 با الگوریتم های BLASTX و BLASTN

Table 4- Homology analysis of Oa424 and Oa1635 transcripts by BLASTX and BLASTN algorithms

نام توالی Sequence name	بلاست BLAST	مقدار ای E- value	درصد تطابق Identity %	شماره دسترس Accession	توضیحات Description
Oa1635	BLASTX	2e-09	72.73	GFP84907.1	Retrovirus-related pol polyprotein from transposon tnt 1-94 [<i>Phtheirospermum japonicum</i>] (Orobanchaceae)
		3e-08	65.91	ABA97652.1	Retrotransposon protein, putative, Ty1-copia subclass [<i>Oryza sativa</i> Japonica Group]
	BLASTN	9e-06	72.27	XR_005157610.1	<i>Triticum dicoccoides</i> uncharacterized LOC119325638 (LOC119325638), transcript variant X3, ncRNA
Oa424		3e-05	86.79	XM_023302364.2	<i>Zea mays</i> probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein
	BLASTX	2e-41	71.57	XP_011081407.1	uncharacterized protein LOC105164455 [<i>Sesamum indicum</i>]
		4e-28	55.34	VFQ92043.1	unnamed protein product [<i>Cuscuta campestris</i>]
	BLASTN	1e-38	72.93	XM_011083105.1	<i>Sesamum indicum</i> uncharacterized LOC105164455 (LOC105164455), mRNA
	6e-22	69.07	XM_012975170.1	<i>Erythranthe guttatus</i> uncharacterized LOC105951718 (LOC105951718), mRNA	

منابع

- Alakonya, A., Kumar, R., Koenig, D., Kimura, S., Townsley, B., Runo, S., Garces, H.M., Kang, J., Yanez, A., David-Schwartz, R., Machuka, J., & Sinha, N. (2012). Interspecific RNA Interference of SHOOT MERISTEMLESS-Like Disrupts *Cuscuta pentagona* Plant Parasitism. *The Plant Cell* 24(7): 3153-3166. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.099994>.
- Aravind, L., Iyer, L. M., Balaji, S., & Babu, M.M. (2006). The natural history of the WRKY-GCM1 zinc fingers and the relationship between transcription factors and transposons. *Nucleic Acids Research* 34(22): 6505-6520. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl888>.

3. Bundock, P., & Hooykaas, P. (2005). An Arabidopsis hAT-like transposase is essential for plant development. *Nature* 436(7048): 282-284. <https://doi.org/10.1038/nature03667>.
4. Chai, M., Zhu, X., Cui, H., Jiang, C., Zhang, J., & Shi, L. (2015). Lily Cultivars Have Allelopathic Potential in Controlling *Orobanchae aegyptiaca* Persoon. *PloS one* 10(11): e0142811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142811>.
5. Delavault, P. (2015). Knowing the Parasite: Biology and Genetics of Orobanchae. *Helia* 38(69): 15-29. <https://doi.org/10.1515/helia-2014-0030>.
6. Doyle, J. (1991) *DNA Protocols for Plants*. p. 283-293. In: Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B. and Young, J.P.W. (Eds.) *Molecular Techniques in Taxonomy*, Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18.
7. Govindarajulu, M., Epstein, L., Wroblewski, T., & Michelmore, R.W. (2015). Host-induced gene silencing inhibits the biotrophic pathogen causing downy mildew of lettuce. *Plant Biotechnology Journal*, 13(7): 875-883. <https://doi.org/10.1111/pbi.12307>.
8. Gressel, J., Hanafi, A., Head, G., Marasas, W., Obilana, A.B., Ochanda, J., & Tzotzos, G. (2004). Major heretofore intractable biotic constraints to African food security that may be amenable to novel biotechnological solutions. *Crop protection* 23(8): 661-689. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.11.014>.
9. Grimm, S., & Voß-Neudecker, F. (2003). High-purity plasmid isolation using silica oxide. p. 83-87. In N. Casali & A. Preston (Eds.) *E. coli Plasmid Vectors*. Humana Press.
10. Joel, D., Hershenhorn, J., Eizenberg, H., Aly, R., Ejeta, G., Rich, P., & Rubiales, D. (2007). Biology and management of weedy root parasites. *Horticultural Reviews* 33: 267-349. <https://doi.org/10.1002/9780470168011.ch4>.
11. Koch, A., & Kogel, K.H. (2014). New wind in the sails: Improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. *Plant Biotechnology Journal* 12(7): 821-831. <https://doi.org/10.1111/pbi.12226>.
12. Leoni, C., Volpicella, M., De Leo, F., Gallerani, R., & Ceci, L.R. (2011). Genome walking in eukaryotes. *The FEBS Journal* 278(21): 3953-3977. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08307.x>.
13. Li, J.-F., Li, L., & Sheen, J. (2010). Protocol: a rapid and economical procedure for purification of plasmid or plant DNA with diverse applications in plant biology. *Plant Methods* 6(1): 1. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-6-1>.
14. Lin, R., Ding, L., Casola, C., Ripoll, D.R., Feschotte, C., & Wang, H. (2007). Transposase-derived transcription factors regulate light signaling in *Arabidopsis*. *Science* 318(5854): 1302-1305. <https://doi.org/10.1126/science.1146281>.
15. Moon, D.C., Choi, C.H., Lee, S.M., Lee, J.H., Kim, S.I., Kim, D.S., & Lee, J.C. (2012). Nuclear Translocation of *Acinetobacter baumannii* Transposase Induces DNA Methylation of CpG Regions in the Promoters of E-cadherin Gene. *PloS One* 7(6): e38974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038974>.
16. Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). The inoue method for preparation and transformation of competent *E. coli*: "ultra-competent" cells. *Csh Protoc* 2006(1): 10-1101.
17. Singh, H.P., Batish, D.R., & Kohli, R.K. (2006). *Handbook of Sustainable Weed Management*: Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1201/9781482293593>.
18. Tang, W., Wang, W., Chen, D., Ji, Q., Jing, Y., Wang, H., & Lin, R. (2012). Transposase-derived proteins FHY3/FAR1 interact with phytochrome-interacting factor1 to regulate chlorophyll biosynthesis by modulating during deetiolation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24(5): 1984-2000. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.097022>.
19. Tomilov, A.A., Tomilova, N.B., Wroblewski, T., Michelmore, R., & Yoder, J.I. (2008). Trans-specific gene silencing between host and parasitic plants. *The Plant Journal* 56(3): 389-397. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2008.03613.x>.
20. Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10: 57. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>.
21. Yang, Z., Wafula, E.K., Honaas, L. A., Zhang, H., Das, M., Fernandez-Aparicio, M., & Der, J.P. (2014). Comparative transcriptome analyses reveal core parasitism genes and suggest gene duplication and repurposing as sources of structural novelty. *Molecular Biology and Evolution* 32(3): 767-790. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu343>.
22. Yoder, J.I., Gunathilake, P., Wu, B., Tomilova, N., & Tomilov, A.A. (2009). Engineering host resistance against parasitic weeds with RNA interference. *Pest Management Science* 65(5): 460-466. <https://doi.org/10.1002/ps.1696>.