ارزیابی بیوانفورماتیکی ناحیه ژنی کدکننده آنزیم زایلان در برخی گونه‌های آسپرژیلوس

آیدین حسن‌زاده[1*]، محمد علی تاجیک قنبری[2]

۱-دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

[2]-دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

*صندوق پستی ٤٨١٨١٦٨٩٨٤، ساری، ایران
a.hasanzadeh@sanru.ac.ir

دریافت: ۱٤۰۲/۰۱/۲۹ پذیرش: ۱٤۰۳/۰۳/۲۲

چکیده

جنس آسپرژیلوس دارای گونه‌های متعددی است که در داروسازی، کشاورزی و صنایع مختلف اهمیت دارند. ٤٤٦ گونه برای جنس آسپرژیلوس شناسایی شده است که تشخیص آنها از یکدیگر با کمک خصوصیات ریخت‌شناسی دشوار است. زایلان بتا ۱و٤ زایلوسیداز، آنزیمی است که فرایند هیدرولیز زایلوز را در زایلوالیگوساکاریدها کاتالیز می‌کند و توسط گونه‌های مختلف آسپرژیلوس تولید می‌شود. این پژوهش با هدف مطالعه بیوانفورماتیکی ناحیه ژنی مرتبط با این آنزیم و ارزیابی شباهت‌ها و تفاوت‌های آن در برخی گونه‌های آسپرژیلوس انجام شد. نتایج نشان داد این ناحیه ژنی به‌دلیل وجود موتیف‌های حفاظت شده، توانست برخی گونه‌های مورد بررسی در این پژوهش را از یکدیگر تفکیک کند.

کلید واژگان: آنزیم بتا زایلوسیداز، توالی آمینواسیدی، نواحی حفاظت شده، نشانگر مولکولی.

۱-مقدمه

جنس آسپرژیلوس گونه‌های متعددی دارد که در سرتاسر دنیا در زیستگاه های مختلف پراکنده هستند و در داروسازی، کشاورزی و صنایع مختلف اهمیت دارند. این گونه ها به‌عنوان عوامل بیماری‌زای گیاهی، انسانی و حیوانی شناخته شده‌اند و منجر ب فساد مواد غذایی می‌شوند و میکوتوکسین تولید می کنند. علاوه بر این، بسیاری از این گونه ها در بیوتکنولوژی برای تولید متابولیت‌های مختلف مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، اسیدهای آلی، دارو ها، آنزیم ها و یا به‌عنوان عوامل تخمیرکننده مواد غذایی، استفاده می شوند. طبقه‌بندی و شناسایی گونه‌های این جنس بر اساس خصوصیات فنوتیپی آنها است، اما در دهه‌های اخیر، به‌شدت تحت تاثیر خصوصیات مولکولی و شیمیایی قرار گرفته است [۱، ۱۲]. جنس آسپرژیلوس شامل ٤٤٦ گونه تائید شده است که در ۲۷ بخش از جمله *Aenei*، *Aspergillus*، *Bispori*، *Candidi*، *Cavernicolarum*، *Cervini*، *Circumdati*، *Clavati*، *Cremei*، *Flavi*، *Flavipedes*، *Fumigati*، *Janorum*، *Nigri*، *Nidulantes*، *Ochraceorosei*، *Petersoniorum*، *Polypaecilum*، *Raperorum*، *Restricti*، *Robusti*، *Silvatici*، *Sparsi*، *Tannerorum*، *Terrei*، *Usti* و *Vargarum* قرار گرفته‌اند [۵]. در بخش های مختلف این جنس، از جمله بخش *Flavi*، گونه هایی وجود دارند که تشخیص آنها از یکدیگر با کمک خصوصیات ریخت‌شناسی دشوار است [۸].

همی‌سلولزها دومین پلی‌ساکارید فراوان در طبیعت هستند. هترو ۱و٤ بتا دی‌زایلان‌ها[1] از ترکیبات اصلی همی‌سلولزها می‌باشند که عمدتا در گیاهان علفی، غلات و چوب‌های سخت یافت می‌شوند. زایلان بتا ۱و٤ زایلوسیداز[2]، آنزیمی است که فرایند هیدرولیز زایلوز را در زایلوالیگوساکاریدها کاتالیز می کند و در کنار سلولازها و همی سلولازها می تواند به هیدرولیز لیگنوسلولز و تولید سوخت‌های زیستی اتانول و بوتانول، کمک کند. همچنین، بهبود خواص پخت خمیر نان، افزایش قابلیت هضم خوراک دام، تولید دی‌زایلوز برای تولید زایلیتول و جوهرزدایی از کاغذ بازیافتی، از دیگر کاربردهای مهم این آنزیم در صنعت است [٤، ١٤].

ابزارهای مولکولی از جمله نواحی ژنی *ITS* برای تشخیص گونه‌های فیلوژنتیک، به‌طور فزاینده‌ای استفاده می‌شوند [۱۳]. با این‌حال، این امکان برای شناسایی صحیح همه گونه‌های آسپرژیلوس کافی نیست و بنابراین، به یک نشانگر ثانویه نیاز است [۱۲]. ناحیه فاصله‌گذار داخلی DNA ریبوزومی (*ITS1*، 5.8S و *ITS2*)، به‌عنوان بارکد DNA برای شناسایی قارچ‌ها به رسمیت شناخته شده [۱۳] و به‌طور گسترده استفاده شده است و توالی بیشماری از آن تولید و به ثبت رسیده است. بنابراین، می‌توان از این نشانگر برای تشخیص اولیه یک جنس و یا یک گونه استفاده کرد اما در همه موارد تنوع کافی برای تمایز بین همه گونه ها بر اساس این ناحیه ژنی وجود ندارد. بنابراین، به یک نشانگر ثانویه نیاز است. این نشانگر ثانویه می‌بایست همانند نشانگر *ITS* دارای کاربرد گسترده باشد، تکثیر آن آسان باشد و برخلاف نشانگر *ITS*، باید بتواند بین همه گونه های یک جنس، تمایز ایجاد کند. همچنین، وجود توالی های ثبت شده و تعداد گونه های توالی یابی شده در پایگاه داده های موجود برای ژن موردنظر از دیگر خصوصیات گزینش نشانگر ثانویه می‌باشد [۱۲]. نشانگرهای ثانویه می‌توانند با تمایز حداقل اختلاف بین گونه ها، به تفکیک گونه های نزدیک بهم کمک کند. در این مقاله، استفاده از ناحیه ژنی مرتبط با آنزیم زایلان بتا ۱و٤ زایلوسیداز به‌عنوان یک نشانگر ثانویه برای شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس، بحث شد.

۲-مواد و روش‌ها

[1] hetero1,4-β-D-xylans

[2] xylan 1,4- β-xylosidase (3.2.1.37)

در این پژوهش، تلاش شد تا با گزینش تعداد بیشتری از گونه‌های مختلف جنس آسپرژیلوس، قدرت تفکیک ناحیه ژنی مورد بررسی با دقت بالا ارزیابی شود؛ همچنین، براساس استاندارد ارزیابی‌های بیوانفورماتیک سعی شد تعداد توالی از ۸۰ توالی بیشتر نشود تا خطای روش‌های بیوانفورماتیکی مورد استفاده از جمله هم‌ردیف کردن توالی‌ها به حداقل برسد؛ بر این اساس، ۸۰ توالی آمینواسیدی آنزیم زایلان بتا ۱و٤ زایلوسیداز مربوط به ١٤ گونه از قارچ *Aspergillus* spp. ارزیابی شد (جدول ۱). برای این کار، توالی‌هایی با طول ۹۰۰–۷۰۰ آمینواسید در قالب فایل FASTA از بانک پروتئین UniProtKB دریافت شد [۳]. همچنین، برای بررسی دومین‌های حفاظت شده در این ناحیه ژنی، از پایگاه InterProScan و نرم‌افزار COBALT در پایگاه NCBI استفاده شد [۷، ۱۰]. شناسایی موتیف‌های حفاظت شده و تعیین موقعیت این موتیف‌ها در دومین‌ها، با استفاده از نرم‌افزار MEME V5.5.1 با پارامترهای پیش‌فرض شامل انتخاب موتیف‌ها بدون توجه به دفعات تکرار، شناسایی حداکثر ۱۰ موتیف و کمترین و بیشترین طول موتیف‌ها به ترتیب ٦ و ٥٠ آمینواسید، آنالیز شدند [۲]. توالی‌های آمینواسیدی با استفاده از الگوریتم ClustalW هم‌ردیف شدند و در نهایت، درخت فیلوژنی با نرم‌افزار MEGA11، روش Neighbor-Joining و آنالیز Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شد [۱۵]. برای ریشه‌دار کردن درخت تبارزایی، از توالی آمینواسیدی مربوط به ناحیه ژنی بتا ۱و۳ اندوگلوکاناز گونه *Trichoderma harzianum* استفاده شد.

جدول ۱ فهرست گونه‌های مورد ارزیابی در این پژوهش

Accession number	Species	Amino acids
A0A2G7FSE4	*Aspergillus arachidicola*	893
A0A5N6XW48	*Aspergillus arachidicola*	797
A0A5N6Y0M6	*Aspergillus arachidicola*	797
A0A5N6Y9H3	*Aspergillus arachidicola*	904
A0A8H6PJN5	*Aspergillus felis*	771
A0A8H6QS47	*Aspergillus felis*	897
A0A8H6R5T7	*Aspergillus felis*	771
A0A8H6UKX1	*Aspergillus felis*	712
A0A8H6USJ0	*Aspergillus felis*	792
A0A8H6V9T4	*Aspergillus felis*	792
A0A3M7K815	*Aspergillus flavus*	798
A0A3M7KAD1	*Aspergillus flavus*	776
A0A3M7KC82	*Aspergillus flavus*	905
A0A5N6GLQ5	*Aspergillus flavus*	798
A0A5N6H3A7	*Aspergillus flavus*	776
A0A5N6HG57	*Aspergillus flavus*	905
A0A7U2MQJ9	*Aspergillus flavus*	797
A0A7U2MWQ8	*Aspergillus flavus*	882
A0A7U2N011	*Aspergillus flavus*	797
A0A0D9N849	*Aspergillus flavus*	798
A0A0D9N8W0	*Aspergillus flavus*	776

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــ

A0A2P2HGP4	*Aspergillus flavus*	822
A0A7G5IRD3	*Aspergillus flavus*	797
A0A7G5JH06	*Aspergillus flavus*	905
A0A7G5JK96	*Aspergillus flavus*	776
B8NCQ0	*Aspergillus flavus*	775
A0A0J5PIG3	*Aspergillus fumigatus*	792
A0A0J5PQ76	*Aspergillus fumigatus*	771
B6EY09	*Aspergillus japonicus*	804
A0A8T8WVV3	*Aspergillus japonicus*	804
A0A8T8WXY9	*Aspergillus japonicus*	785
G7X4N9	*Aspergillus kawachii*	788
A0A146FM17	*Aspergillus kawachii*	804
A0A7R7W4B8	*Aspergillus kawachii*	745
A0A7R8A950	*Aspergillus kawachii*	800
A0A0S7DMT2	*Aspergillus lentulus*	784
A0A0S7DQL3	*Aspergillus lentulus*	771
A0A0S7E3L1	*Aspergillus lentulus*	792
A0A8H3PAK3	*Aspergillus lentulus*	771
A0A8H3RNN1	*Aspergillus lentulus*	792
A0A8H3XNR4	*Aspergillus lentulus*	784
A0A8H4DF63	*Aspergillus lentulus*	771
A0A8H4DSJ2	*Aspergillus lentulus*	784
A0A8H4FZF3	*Aspergillus lentulus*	792
A0A023J5W7	*Aspergillus niger*	777
A0A060IKI3	*Aspergillus niger*	804
A0A0S2CWH4	*Aspergillus niger*	804
A0A100I443	*Aspergillus niger*	805
A0A1V1FQ75	*Aspergillus niger*	797
A0A254TWZ1	*Aspergillus niger*	804
O00089	*Aspergillus niger*	804
G3XTV1	*Aspergillus niger*	804
A0A370BTQ4	*Aspergillus niger*	804
A0A0F8U3A7	*Aspergillus ochraceoroseus*	793
A0A2T5M7W1	*Aspergillus ochraceoroseus*	793
I7ZNQ8	*Aspergillus oryzae*	797
I8IAF1	*Aspergillus oryzae*	822
I8IR17	*Aspergillus oryzae*	798
Q2U176	*Aspergillus oryzae*	822
Q2UR38	*Aspergillus oryzae*	798
A0A1S9DFY1	*Aspergillus oryzae*	776
A0A1S9DUU6	*Aspergillus oryzae*	798
A0A5N6DQV4	*Aspergillus parasiticus*	797

A0A5N6DWQ7	*Aspergillus parasiticus*	904
A0A0F0I2L5	*Aspergillus parasiticus*	904
A0A0F0I5N2	*Aspergillus parasiticus*	797
A0A5N6HNP0	*Aspergillus pseudonomiae*	908
A0A5N6HP88	*Aspergillus pseudonomiae*	794
A0A5N6IB67	*Aspergillus pseudonomiae*	762
A0A5N7CZP8	*Aspergillus pseudonomiae*	794
A0A5N7DRR8	*Aspergillus pseudonomiae*	776
A0A830ZZW7	*Aspergillus sydowii*	784
A0A1L9T5R3	*Aspergillus sydowii*	773
A0A1L9TZR0	*Aspergillus sydowii*	784
A0A8E0QK25	*Aspergillus udagawae*	771
A0A8E0QZ37	*Aspergillus udagawae*	792
A0A8E0R1C4	*Aspergillus udagawae*	784
A0A8H3PCY1	*Aspergillus udagawae*	771
A0A8H3PG47	*Aspergillus udagawae*	771
A0A8H3SCC4	*Aspergillus udagawae*	784
A0A0F9X3H7*	*Trichoderma harzianum*	834

* به‌عنوان ریشه درخت استفاده شد.

۳-نتایج و بحث

بررسی ناحیه ژنی آنزیم زایلان بتا ۱و٤ زایلوسیداز با استفاده از پایگاه InterProScan نشان داد در توالی‌های آمینواسیدی این ناحیه ژنی، سه و در مواردی چهار دومین حفاظت شده وجود دارد (جدول ۲) و وجود این دومین‌ها در توالی‌های مورد بررسی، تائید شد (شکل ۱). همچنین، وجود دومین‌ها با استفاده از نرم‌افزار COBALT در پایگاه NCBI تائید شد (شکل ۲). نتایج بررسی دومین‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEME V5.5.1 نشان داد در تمامی توالی‌های آمینواسیدی مورد ارزیابی در ناحیه ژنی مورد نظر، ۱۰-۹ موتیف وجود دارد. همچنین، نتایج نشان داد موقعیت این موتیف‌ها نسبت به هم متفاوت بود و این تفاوت‌ها منجر به تفکیک توالی‌ها شد. موتیف‌های شناسایی شده و نحوه پراکنش این موتیف‌ها در توالی‌های آمینواسیدی مورد بررسی در این پژوهش، در شکل ۳ و ٤ نشان داده شده است. اندازه هر آمینواسید، بیانگر فراوانی آن در موتیف مربوطه می‌باشد (شکل ۳).

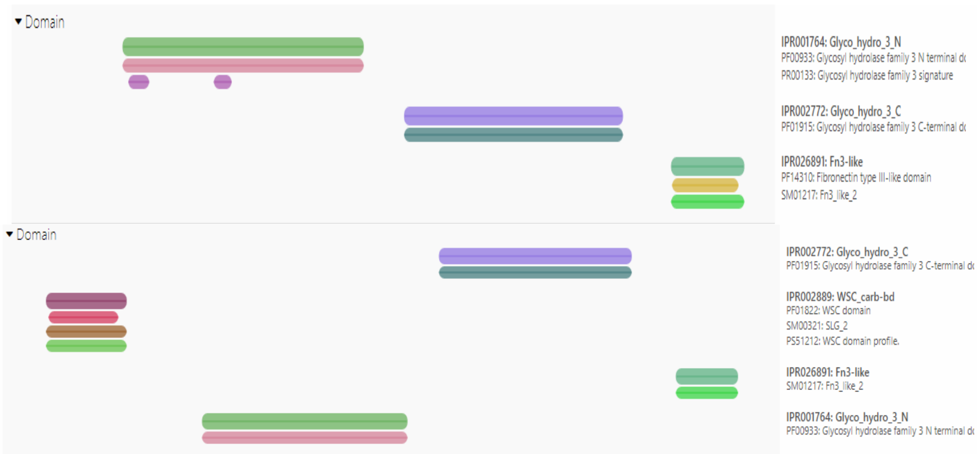
نتایج بررسی درخت تبارزایی نشان داد گونه‌های مورد ارزیابی، در مواردی به خوبی از یکدیگر تفکیک شدند و از ۸۰ توالی و ١٤ گونه مورد بررسی، در برخی موارد گونه‌های غیرهمنام در کنار هم قرار گرفتند (جدول ۳ و شکل ۵). در این بررسی، گونه‌هایی از پنج بخش جنس آسپرژیلوس شامل *Flavi*، *Fumigati*، *Nidulantes*، *Nigri* و *Ochraceorosei* ارزیابی شدند. نتایج ارزیابی نشان داد ناحیه ژنی مورد مطالعه توانست این بخش‌ها را از یکدیگر تفکیک کند. همچنین، در درخت تبارزایی مشاهده شد در اغلب موارد، توالی‌های با طول یکسان از هر بخش، در یک شاخه قرار گرفتند (جدول ۳).

در بخش *Flavi*، ٣٦ توالی از پنج گونه *A. arachidicola*، *A. flavus*، *A. oryzae*، *A. parasiticus* و *A. pseudonomiae* ارزیابی شد. هفت توالی گونه *A. oryzae* در بین ١٦ توالی گونه *A. flavus* قرار گرفتند. این نتیجه می‌تواند به‌دلیل وجود تشابهات بالا در ناحیه ژنی کدکننده این آنزیم در این دو گونه باشد و در نتیجه مانع از تفکیک دقیق این دو گونه شد.

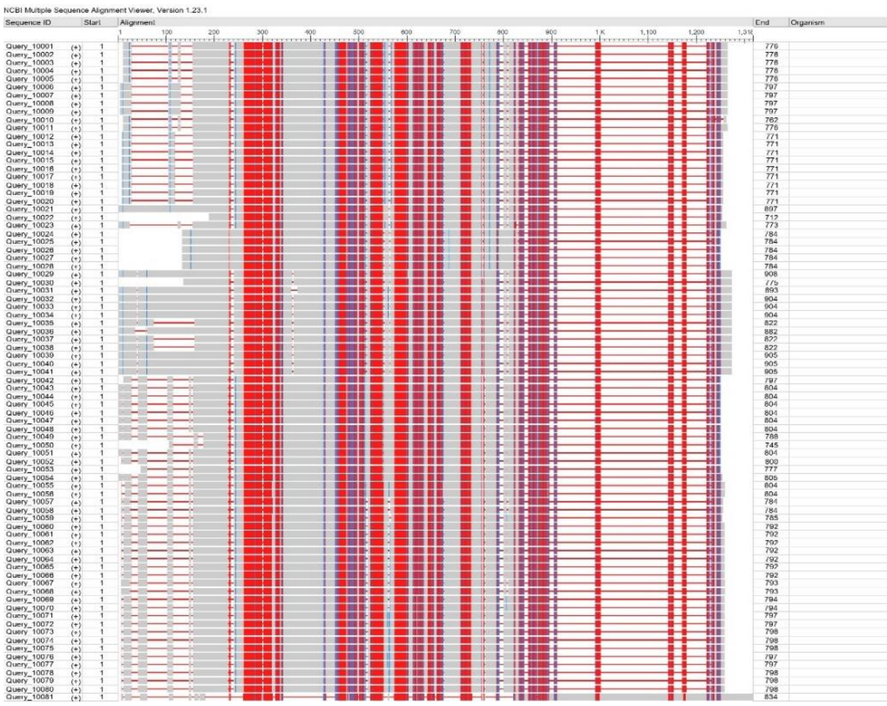
جدول ۲ فهرست دومین‌های شناسایی شده با استفاده از پایگاه InterProScan

Accession number	Domains			
A0A2G7FSE4	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	WSC_carb-bd
A0A5N6XW48	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A5N6Y0M6	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A5N6Y9H3	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	WSC_carb-bd
A0A8H6PJN5	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A8H6QS47	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	WSC_carb-bd
A0A8H6R5T7	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A8H6UKX1	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A8H6USJ0	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A8H6V9T4	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A3M7K815	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A3M7KAD1	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A3M7KC82	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	WSC_carb-bd
A0A5N6GLQ5	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A5N6H3A7	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A5N6HG57	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	WSC_carb-bd
A0A7U2MQJ9	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A7U2MWQ8	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	WSC_carb-bd
A0A7U2N011	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A0D9N849	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A0D9N8W0	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A2P2HGP4	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A7G5IRD3	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A7G5JH06	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	WSC_carb-bd
A0A7G5JK96	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
B8NCQ0	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A0J5PIG3	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A0J5PQ76	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
B6EY09	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A8T8WVV3	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A8T8WXY9	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
G7X4N9	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A146FM17	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A7R7W4B8	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A7R8A950	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A0S7DMT2	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A0S7DQL3	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A0S7E3L1	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A8H3PAK3	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	

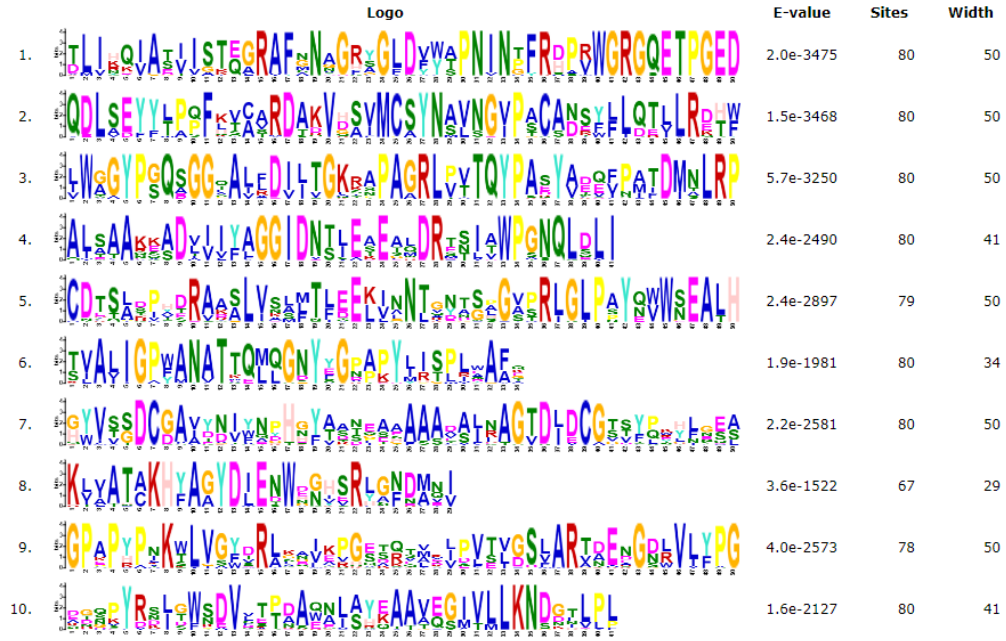
A0A8H3RNN1	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A8H3XNR4	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A8H4DF63	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A8H4DSJ2	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A8H4FZF3	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A023J5W7	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A060IKI3	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A0S2CWH4	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A100I443	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A1V1FQ75	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A254TWZ1	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
O00089	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
G3XTV1	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A370BTQ4	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A0F8U3A7	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A2T5M7W1	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
I7ZNQ8	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
I8IAF1	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
I8IR17	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
Q2U176	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
Q2UR38	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A1S9DFY1	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A1S9DUU6	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A5N6DQV4	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A5N6DWQ7	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	WSC_carb-bd
A0A0F0I2L5	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	WSC_carb-bd
A0A0F0I5N2	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A5N6HNP0	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	WSC_carb-bd
A0A5N6HP88	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A5N6IB67	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A5N7CZP8	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A5N7DRR8	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A830ZZW7	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A1L9T5R3	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A1L9TZR0	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A8E0QK25	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A8E0QZ37	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A8E0R1C4	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A8H3PCY1	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A8H3PG47	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	
A0A8H3SCC4	Fn3-like	Glyco_hydro_3_C	Glyco_hydro_3_N	



شکل ۱ ساختار دومین‌های حفاظت شده با استفاده از پایگاه InterProScan



شکل ۲ ساختار دومین‌های حفاظت شده با استفاده از نرم‌افزار COBALT



شکل ۳ موتیف لوگو در توالی‌های آمینواسیدی با نرم‌افزار MEME

جدول ۳ ارزیابی درخت فیلوژنی ۸۰ توالی آمینواسیدی در برخی گونه‌های قارچ آسپرژیلوس

* به‌عنوان ریشه درخت استفاده شد.

Accession number	Species	Amino acids	No. Domains	Section
A0A5N6H3A7	*Aspergillus flavus*	776	3	*Flavi*
A0A0D9N8W0	*Aspergillus flavus*	776	3	*Flavi*
A0A1S9DFY1	*Aspergillus oryzae*	776	3	*Flavi*
A0A3M7KAD1	*Aspergillus flavus*	776	3	*Flavi*
A0A7G5JK96	*Aspergillus flavus*	776	3	*Flavi*
A0A5N6Y0M6	*Aspergillus arachidicola*	797	3	*Flavi*
A0A5N6DQV4	*Aspergillus parasiticus*	797	3	*Flavi*
A0A7U2N011	*Aspergillus flavus*	797	3	*Flavi*
I7ZNQ8	*Aspergillus oryzae*	797	3	*Flavi*
A0A5N6IB67	*Aspergillus pseudonomiae*	762	3	*Flavi*
A0A5N7DRR8	*Aspergillus pseudonomiae*	776	3	*Flavi*
A0A0S7DQL3	*Aspergillus lentulus*	771	3	*Fumigati*
A0A8H3PAK3	*Aspergillus lentulus*	771	3	*Fumigati*
A0A8H4DF63	*Aspergillus lentulus*	771	3	*Fumigati*
A0A0J5PQ76	*Aspergillus fumigatus*	771	3	*Fumigati*

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــ

A0A254TWZ1	*Aspergillus niger*	804	3	*Nigri*
A0A370BTQ4	*Aspergillus niger*	804	3	*Nigri*
A0A060IKI3	*Aspergillus niger*	804	3	*Nigri*
A0A0S2CWH4	*Aspergillus niger*	804	3	*Nigri*
G7X4N9	*Aspergillus kawachii*	788	3	-
A0A7R7W4B8	*Aspergillus kawachii*	745	3	-
A0A146FM17	*Aspergillus kawachii*	804	3	-
A0A7R8A950	*Aspergillus kawachii*	800	3	-
A0A023J5W7	*Aspergillus niger*	777	3	*Nigri*
A0A100I443	*Aspergillus niger*	805	3	*Nigri*
B6EY09	*Aspergillus japonicus*	804	3	*Nigri*
A0A8T8WVV3	*Aspergillus japonicus*	804	3	*Nigri*
A0A830ZZW7	*Aspergillus sydowii*	784	3	*Nidulantes*
A0A1L9TZR0	*Aspergillus sydowii*	784	3	*Nidulantes*
A0A8T8WXY9	*Aspergillus japonicus*	785	3	*Nigri*
A0A8H6USJ0	*Aspergillus felis*	792	3	*Fumigati*
A0A8H6V9T4	*Aspergillus felis*	792	3	*Fumigati*
A0A8E0QZ37	*Aspergillus udagawae*	792	3	*Fumigati*
A0A0S7E3L1	*Aspergillus lentulus*	792	3	*Fumigati*
A0A8H3RNN1	*Aspergillus lentulus*	792	3	*Fumigati*
A0A8H4FZF3	*Aspergillus lentulus*	792	3	*Fumigati*
A0A0J5PIG3	*Aspergillus fumigatus*	792	3	*Fumigati*
A0A0F8U3A7	*Aspergillus ochraceoroseus*	793	3	*Ochraceorosei*
A0A2T5M7W1	*Aspergillus ochraceoroseus*	793	3	*Ochraceorosei*
A0A5N6HP88	*Aspergillus pseudonomiae*	794	3	*Flavi*
A0A5N7CZP8	*Aspergillus pseudonomiae*	794	3	*Flavi*
A0A5N6XW48	*Aspergillus arachidicola*	797	3	*Flavi*
A0A0F0I5N2	*Aspergillus parasiticus*	797	3	*Flavi*
Q2UR38	*Aspergillus oryzae*	798	3	*Flavi*

A0A3M7K815	*Aspergillus flavus*	798	3	*Flavi*
A0A1S9DUU6	*Aspergillus oryzae*	798	3	*Flavi*
A0A7U2MQJ9	*Aspergillus flavus*	797	3	*Flavi*
A0A7G5IRD3	*Aspergillus flavus*	797	3	*Flavi*
A0A0D9N849	*Aspergillus flavus*	798	3	*Flavi*
A0A5N6GLQ5	*Aspergillus flavus*	798	3	*Flavi*
I8IR17	*Aspergillus oryzae*	798	3	*Flavi*
A0A0F9X3H7*	*Trichoderma harzianum*	834	-	-

در مطالعات مختلف گزارش شده است که تفکیک دقیق این دو گونه از یکدیگر با استفاده از نواحی ژنی مانند *ITS* و *β-tubulin* امکان‌پذیر نیست [۸]. توالی‌های دو گونه *A. arachidicola* و *A. parasiticus* در شاخه‌های یکسان قرار گرفتند و تفکیک آنها از یکدیگر به‌طور دقیق صورت نگرفت، هر چند در دو مورد دو توالی از این دو گونه در گروه‌های خواهری مجزا قرار گرفتند (جدول ۳ و شکل ۵). از پنج توالی گونه *A. pseudonomiae*، به استثنای توالی A0A5N6HNP0، مابقی در گروه‌های خواهری قرار گرفتند و تفکیک آنها از سایر گونه‌ها به خوبی انجام شد.

در بخش *Fumigati*، ۲۳ توالی از چهار گونه *A. felis*، *A. fumigatus*، *A. lentulus* و *A. udagawae* ارزیابی شد. تفکیک در این شاخه در اغلب موارد به خوبی انجام شد و توالی‌های مربوط به گونه‌ها در گروه‌های خواهری قرار گرفتند (جدول ۳ و شکل ۵).

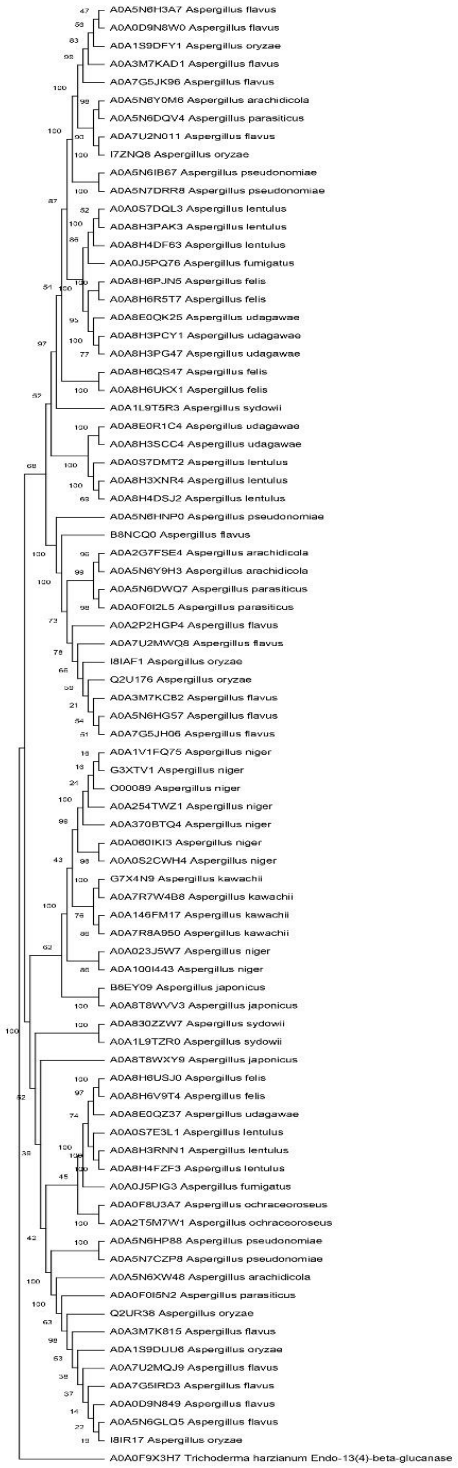
در بخش *Nigri*، ۱۲ توالی از دو گونه *A. niger* و *A. japonicus* ارزیابی شد. هفت مورد از ۹ توالی مربوط به گونه *A. niger* در یک شاخه و دو توالی دیگر در یک گروه خواهری قرار گرفتند و تفکیک به خوبی انجام شد. از سه توالی گونه *A. japonicus*، دو توالی در یک گروه خواهری قرار گرفتند. همچنین، توالی‌های گونه *A. kawachii*، با قرار گرفتن در گروه‌های خواهری، به خوبی از سایر گونه‌ها تفکیک شدند. در آخرین فهرست منتشر شده مربوط به گونه‌های تائید شده جنس آسپرژیلوس [۵]، نام این گونه ذکر نشده است؛ با توجه به قرار گرفتن این گونه در بین توالی‌های گونه *A. niger*، پیشنهاد می‌شود امکان قرار گرفتن این گونه در بخش *Nigri*، مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

در بخش *Nidulantes*، سه توالی از گونه *A. sydowii* و در بخش *Ochraceorosei*، دو توالی از گونه *A. ochraceoroseus*، ارزیابی شد و این توالی‌ها با قرار گرفتن در گروه‌های خواهری مجزا، به درستی از یکدیگر و سایر گونه‌ها تفکیک شدند.

برای ریشه‌دار کردن درخت تبارزایی، از توالی آمینواسیدی مربوط به ناحیه ژنی بتا ۱و۳ اندوگلوکاناز گونه *T. harzianum* استفاده شد که نتایج نشان داد به‌دلیل وجود تفاوت این دو ناحیه ژنی، تفکیک به درستی انجام شده و درخت ریشه‌دار شد.

براساس معیارهای لازم برای گزینش نشانگر ثانویه، سه نشانگر شامل کالمودولین (CaM)، بتاتوبولین (BenA) و دومین زیرواحد بزرگ RNA polymerase II (RPB2)، در بین نشانگرهای موجود بررسی شدند [۱۲]. در خصوص نشانگر RPB2، تکثیر آن آسان نیست و استفاده از آن به‌عنوان نشانگر شناسایی ثانویه، کارایی لازم را ندارد. در مقابل، تکثیر BenA آسان است، اما نتایج تحقیقات نشان داده است که در تعداد اینترون‌ها متفاوت بوده و بنابراین، گاهی انجام PCR منجر به تکثیر ژن‌های مشابه می‌شود [٦، ۱۱].

شکل ٤ آنالیز موتیف در توالی‌های آمینواسیدی و پراکنش موتیف‌های شناسایی شده با نرم‌افزار MEME

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــ


شکل ۵ درخت فیلوژنی ۸۰ توالی آمینواسیدی در برخی گونه‌های قارچ آسپرژیلوس با استفاده از نرم‌افزار MEGA11، روش Neighbor-Joining و آنالیز Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار

در مورد مشابه، در سویه CCF4477 از گونه *A. udagawae* مشاهده شد که استفاده از نشانگر CaM سبب تکثیر یک شبه‌ژن شد و فیلوژنی حاصل دارای یک شاخه بسیار طولانی برای این سویه در کلاد *A. udagawae* بود [۹]. با این حال، تکثیر نشانگر CaM به آسانی انجام می‌شود و در بین همه گونه‌های آسپرژیلوس به جز دو گونه *A. elegans* و *A. steynii* تمایز ایجاد می‌کند [۱۶]. علاوه بر این، پایگاه داده توالی برای این نشانگر برای همه گونه‌های پذیرفته شده آسپرژیلوس تقریبا کامل است [۱۲]. با توجه به تفاوت کارایی هر یک از نشانگرهای ثانویه مورد ارزیابی قرار گرفته در پژوهش‌های مختلف [۶، ۹، ۱۱، ۱۲] و براساس یافته‌های این پژوهش، می‌توان نتیجه گرفت که ناحیه ژنی آنزیم زایلان بتا ۱و٤ زایلوسیداز، به‌دلیل وجود نواحی حفاظت شده شامل دومین‌ها و موتیف‌های شناسایی شده در این پژوهش (شکل ۲ و ٤)، وجود تفاوت‌های درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای در این ناحیه ژنی و در نتیجه توانایی تفکیک بین گونه‌های این جنس، می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر ثانویه برای تفکیک بخش‌های مختلف جنس آسپرژیلوس و برخی از گونه‌های آن، استفاده شود. همچنین، با توجه به وجود تعداد قابل توجهی از توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی برای آنزیم زایلان بتا ۱و٤ زایلوسیداز در گونه‌های مختلف از جمله جنس آسپرژیلوس در دو پایگاه داده توالی NCBI و UniProtKB، امکان گسترش استفاده از این ناحیه ژنی به‌عنوان یک نشانگر ثانوی را فراهم می‌کند.

٤- نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این پژوهش، ناحیه ژنی آنزیم زایلان بتا ۱و٤ زایلوسیداز، توانست به تفکیک برخی از گونه‌های جنس آسپرژیلوس، کمک کند. همچنین، نتایج ارزیابی نشان داد ناحیه ژنی مورد مطالعه توانست بخش‌های مختلف این جنس را از یکدیگر تفکیک کند. وجود نواحی حفاظت شده شامل دومین‌ها و موتیف‌های شناسایی شده در این ناحیه ژنی تائید شد. علاوه بر این، وجود تفاوت‌های درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای در این ناحیه ژنی در بین گونه‌های مورد ارزیابی تایید شد. بر این اساس، استفاده از ناحیه ژنی آنزیم زایلان بتا ۱و٤ زایلوسیداز به‌عنوان یک نشانگر ثانویه برای تفکیک بخش‌های مختلف جنس آسپرژیلوس و برخی از گونه‌های آن، پیشنهاد می‌شود.

۵- منابع

[1] Ashtiani, N.M., Kachuei, R., Yalfani, R., Harchegani, A.B. and Nosratabadi, M., 2017. Identification of *Aspergillus* sections *Flavi*, *Nigri*, and *Fumigati* and their differentiation using specific primers. *Infez Med*, *25*(2), pp.127-132.

[2] Bailey, T.L., Johnson, J., Grant, C.E. and Noble, W.S., 2015. The MEME suite. *Nucleic acids research*, *43*(W1), pp.W39-W49.

[3] Coudert, E., Gehant, S., de Castro, E., Pozzato, M., Baratin, D., Neto, T., Sigrist, C.J., Redaschi, N. and Bridge, A., 2023. Annotation of biologically relevant ligands in UniProtKB using ChEBI. *Bioinformatics*, *39*(1), p.btac793.

[4] Herrmann, M.C., VRSANSKA, M., JURICKOVA, M., HIRSCH, J., BIELY, P. and KUBICEK, C.P., 1997. The β-D-xylosidase of Trichoderma reesei is a multifunctional β-D-xylan xylohydrolase. *Biochemical Journal*, *321*(2), pp.375-381.

[5] Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C.M., Yilmaz, N., Wang, X.C., Meijer, M., Kraak, B., Hubka, V., Bensch, K., Samson, R.A. and Frisvad, J.C., 2020. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in mycology*, *95*, pp.5-169.

[6] Hubka, V. and Kolarik, M., 2012. β-tubulin paralogue tubC is frequently misidentified as the benA gene in *Aspergillus* section Nigri taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 29(1), pp.1-10.

[7] Jones, P., Binns, D., Chang, H.Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H.,

Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G. and Pesseat, S., 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, *30*(9), pp.1236-1240.
[8] Nargesi, S., Abastabar, M., Valadan, R., Mayahi, S., Youn, J.H., Hedayati, M.T. and Seyedmousavi, S., 2021. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus oryzae* Targeting the cyp51A Gene. *Pathogens*, *10*(10), p.1279.
[9] Novakova, A., Hubka, V., Dudova, Z., Matsuzawa, T., Kubatova, A., Yaguchi, T. and Kolarik, M., 2014. New species in *Aspergillus* section Fumigati from reclamation sites in Wyoming (USA) and revision of *A. viridinutans* complex. Fungal Diversity, 64, pp.253-274.
[10] Papadopoulos, J.S. and Agarwala, R., 2007. COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics*, *23*(9), pp.1073-1079.
[11] Peterson, S.W., 2008. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. Mycologia, 100(2), pp.205-226.
[12] Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraken, J., Hong, S.B., Hubka, V., Klaassen, C.H., Perrone, G., Seifert, K.A., Susca, A., Tanney, J.B. and Varga, J., 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, *78*(1), pp.141-173.
[13] Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, Fungal Barcoding Consortium Author List, Bolchacova, E. and Voigt, K., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (*ITS*) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the national academy of Sciences*, *109*(16), pp.6241-6246.
[14] Schomburg, D. and Salzmann, M., 1991. Xylan 1, 4-beta-xylosidase. *Enzyme Handbook 4: Class 3: Hydrolases*, pp.229-236.
[15] Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S., 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, *38*(7), pp.3022-3027.
[16] Visagie, C.M., Varga, J., Houbraken, J., Meijer, M., KocsubU, S., Yilmaz, N., Fotedar, R., Seifert, K.A., Frisvad, J.C. and Samson, R.A., 2014. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section Circumdati). Studies in mycology, 78, pp.1-61.

Bioinformatics evaluation of the coding gene region of xylan enzyme in some *Aspergillus* species

Aydin Hassanzadeh[1], Mohammad Ali Tajick Ghanbari[2]

1. PhD student, Department of Plant Protection, Faculty of Crop Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
2. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Crop Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

a.hasanzadeh@sanru.ac.ir

Receipt: 2023/04/18 Accepted: 2024/06/11

Abstract

Aspergillus has many species that are important in medicine, agriculture, and various industries. The genus has 446 identified species, which are difficult to distinguish from each other with the use of morphological characteristics. Xylan 1, 4-beta-xylosidase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis process of xylose in xylooligosaccharides and is produced by different species of *Aspergillus*. This research was conducted with the aim of a bioinformatics study of the gene region related to this enzyme and to evaluate its similarities and differences in some *Aspergillus* species. The results showed that this gene region, due to the presence of conserved motifs, was able to distinguish some species studied in this research.

Keywords: beta-xylosidase enzyme, amino acid sequences, conserved regions, molecular marker.