

مقاله پژوهشی

شناسایی، ساختار و واکاوی فیلوژنتیکی خانواده ژن *MLO* (Mildew Resistance Locus) در گونه‌های *Malus domestica* و *Triticum aestivum* (O)

علی حسینی بدربانی و جهانشیر امینی^{۱*}

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۲۹)

چکیده

نقش ژن *Mlo* در گیاه جو با توجه به اینکه آلل جهش یافته‌ی *mlo* باعث ایجاد یک مقاومت غیراختصاصی و وسیع در برابر بیماری سفیدک پودری ناشی از قارچ *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* می‌شود، کشف گردید. ژن‌های *Mlo* همچنین در رشد گیاهان و در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی نقش مهمی ایفا می‌کنند. خانواده ژن *Mlo* در چندین گونه گیاهی مورد بررسی قرار گرفته است. در این تحقیق برای آشکار کردن خصوصیات ژنتیکی و ساختار پروتئینی خانواده ژن *Mlo* در گیاهان گندم نان (*Triticum aestivum*) و سیب (*Malus domestica*) از ابزارهای بیوانفورماتیکی و موتورهای جستجو در پایگاه‌های اطلاعات ژنومی استفاده گردید. توالی‌های پروتئینی *Mlo* مربوط به گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) به عنوان الگو جهت tBLASTn استفاده شد که در نهایت منجر به شناسایی ۲۹ عضو پروتئینی *MdMlo* و ۱۱ عضو پروتئینی *TaMlo* گردید. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک مقایسه‌ای، پروتئین‌های *MdMlo* و *TaMlo* را به سه خوشه اصلی تقسیم بندی کرد و نشان داد که صرف نظر از نوع گونه‌ی گیاهی، *Mlo1*ها (عضو اول خانواده پروتئین *Mlo* در گیاهان سیب، گندم و آرابیدوپسیس)، *Mlo2*ها، *Mlo3*ها و به همین ترتیب تا *Mlo12*ها، با همدیگر ارتباط نزدیکی دارند. این نتیجه بیانگر این امر است که پس از جدایی این گونه‌ها، هیچ گسترش دیگری در خانواده ژن *Mlo* وجود نداشته است. موتیف‌های کارکردی محافظت شده موجود در پروتئین‌های *Mlo* با استفاده از ابزار MEME بررسی شد و مشخص شد که حداکثر ۱۵ و حداقل ۱۰ موتیف حفاظت شده در ساختار پروتئینی آن‌ها وجود دارد. پیش‌بینی می‌شود که ژن‌های *TaMlo6*، *MdMlo8*، *MdMlo11* و *TaMlo2* که دارای موتیف E/D-F-S- می‌باشند در مقاومت در برابر سفیدک پودری نقش داشته باشند. تجزیه و تحلیل‌های سازمان ژن، خواص پروتئین و دُمین‌های حفاظت شده نشان داد که پارالوگ‌های ژن *Mlo* در گیاهان گندم و سیب نسبت به جفت‌های اُرتولوگ خود از یکدیگر واگراتر هستند.

کلیدواژه: خانواده ژن *Mlo*، اُرتولوگ، پارالوگ، فیلوژنی مقایسه‌ای، موتیف محافظت شده

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hoseinibadrani@gmail.com

۱. دانشجوی دکتری، گروه آموزشی گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان.

۲. دکترای تخصصی، دانشیار، گروه آموزشی گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان.

Identification, structure and phylogenetic analysis of *Mlo* gene family in *Triticum aestivum* and *Malus domestica*

A. Hosseini Badrbani^{1*} and J. Amini²

(Received: 15.3.2020; Accepted: 19.8.2020)

Abstract

Because the mutant *mlo* allele causes a non-race specific and broad-spectrum resistance to powdery mildew caused by *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, the *Mlo* gene was taken into consideration in barley. *Mlo* genes also play important roles in plant growth and responses to biotic and abiotic stresses. The *Mlo* gene family has been studied in several plant species. In this study, we used bioinformatics tools and searches in genomic databases to reveal the genetic characteristics and protein structure of the *Mlo* family in wheat (*Triticum aestivum*) and apple (*Malus domestica*). We employed *Mlo* proteins sequences of *Arabidopsis thaliana* as a template for tBLASTn, which eventually identified 29 MdMlo (*M. domestica* Mlo) proteins and 11 TaMlo proteins (*T. aestivum* Mlo). The comparative phylogenetic analysis classified MdMlo and TaMlo proteins into three main clades and showed that, regardless of plant species, Mlo1s (the first member of the *Mlo* protein family in wheat, apple and *Arabidopsis*), Mlo2s, Mlo3s, and so on up to Mlo12s, are closely related. This indicates that after the separation of these species, no further expansion has been occurred in the *Mlo* gene family. The functionally conserved motifs present in the *Mlo* proteins were investigated using MEME tool, which showed a maximum of 15 and minimum 10 conserved motifs. The genes *TaMlo6*, *MdMlo8*, *MdMlo11*, *TaMlo2*, and *TaMlo1* are predicted to participate in powdery mildew resistance because of having E/D-F-S-F motif. Analysis of gene organization, protein properties, and conserved domains revealed that the *M. domestica* and *T. aestivum* *Mlo* gene paralogs are more divergent from each other than from their orthologous pairs.

Keywords: *Mlo* gene family, paralog, ortholog, comparative phylogenetic, conserved motif.

* Corresponding author's E-mail: hoseinibadrabani@gmail.com

1. University Of Kurdistan

2. Department of Plant Protection, University of Kurdistan

مقدمه

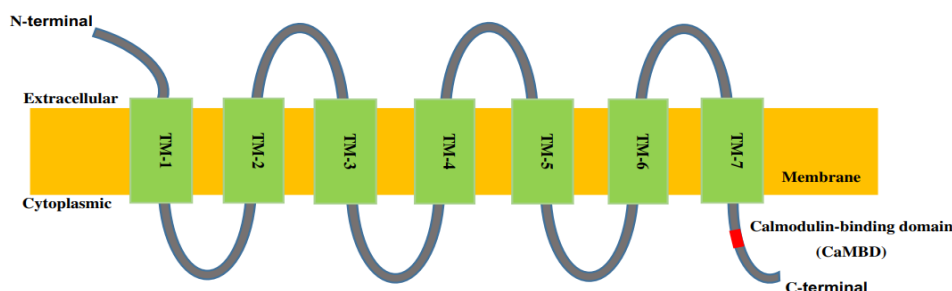
سفیدک پودری (PM) یک بیماری قارچی مضر شناخته شده‌ای می‌باشد که طیف گسترده‌ای از گونه‌های گیاهی، شامل گیاهان علفی تا درختان جنگلی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Liu and Zhu 2008; Severoglu and Ozyigit 2012). در کاربردهای کشاورزی، ژن‌های مقاومت (R-genes) و حساسیت (S-genes) گیاهان برای مقابله با بیماری سفیدک پودری جایگاه مهمی دارند (Parlevliet 1993; Fu et al. 2009). ژن مقاومت ژنی است که یک گیرنده ایمنی را رمزگذاری می‌کند که تشخیص یک محصول ناپرآزار^۱ مشتق از بیمارگر (اغلب یک افکتور) را بر عهده دارد و منجر به فعال شدن دفاع میزبان می‌شود. این واکنش دفاعی قوی اغلب منجر به مرگ سلولی موضعی یا واکنش فوق حساسیت (HR)^۲ می‌شود. در مقابل، هر ژن گیاهی که روند آلودگی را تسهیل می‌کند یا از تعامل سازگار بیمارگر- گیاه حمایت می‌کند ژن حساسیت است. ژن‌های حساسیت در تشخیص میزبان، نفوذ، تکثیر و گسترش به بیمارگر کمک کرده و باعث تنظیم منفی پیام‌رسان‌های ایمنی گیاه میزبان می‌شوند (Filiz and Vatansever 2018; Zaidi et al. 2018). ژن‌های حساسیت در عملیات کشاورزی برای افزایش مقاومت گیاهان و کاهش استفاده از سموم قارچ‌کش از اهمیت بالایی برخوردار هستند (Pessina et al. 2014). ژن‌های حساسیت، با از دست دادن عملکرد، یک مقاومت موروثی مغلوب را به گیاهان اعطا می‌کنند (Pavan et al. 2010). مثلاً از دست دادن عملکرد ژن *MLO* در گیاه جو، مقاومت کامل در برابر بیماری سفیدک سطحی را به ارقام

جو می‌دهد (Büschges et al. 1997). آل مغلوب *mlo* منجر به تشکیل رسوب دیواره سلولی (Jørgensen 1992) و مرگ خودبخودی سلولی می‌شود و در نتیجه باعث انسداد فیزیکی در برابر پیشرفت بیمارگر قارچی می‌شود (Jørgensen 1992; Humphry et al. 2011). بنابراین، بیان آل غالب *Mlo* برای پیشرفت بیماری سفیدک پودری ضروری است (Panstruga 2005b). با این حال در گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)، از دست دادن عملکرد در سه اُرتولوگ خیلی مرتبط با ژن‌های *MLO* شامل *AtMLO2* (*A. thaliana Mlo2*)، *AtMLO6* و *AtMLO12* برای مقاومت کامل لازم است (Consonni et al. 2006). بنابراین یک بیمارگر برای ایجاد بیماری، عملکرد یک ژن کامل *MLO* را در گیاهان لازم دارد (Piffanelli et al. 2002).

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی توالی‌های اسیدآمینه‌ای اعضای خانواده پروتئین *MLO* انگور، آرابیدوپسیس، جو، برنج، ذرت و گوجه فرنگی در یک مطالعه، شش خوشه را در خانواده پروتئین *MLO* شناسایی کرد. خوشه پنجم شامل تمام پروتئین‌های مربوط به حساسیت به سفیدک پودری در دولپه‌ای‌ها بود، در حالی که خوشه چهارم تمام پروتئین‌های حساسیت در برابر سفیدک پودری را در تک لپه‌ای‌ها شامل می‌شد (Pessina et al. 2014). علاوه بر این، هفت دُمین محافظت شده فراغشایی (TMDs)^۳ با یک ناحیه N- ترمینال خارج سلولی و یک دُمین متصل شونده به کالموجولین در ناحیه C- ترمینال سیتوپلاسمی (CaMBD)^۴ برای توصیف پروتئین *MLO* گزارش شد (شکل ۱) (Devoto et al. 1999; Kim et al. 2002a; Kim et al. 2002b).

^۳ transmembrane domains^۴ calmodulin binding domain^۱ avirulence^۲ hypersensitive response

(Kim et al. 2002b; Reddy et al. 2003). حذف نواحی



شکل ۱. مدل شماتیک پیش بینی شده برای پروتئین‌های *MLO*. یک N- ترمینال خارج سلولی و یک ناحیه C- ترمینال سیتوپلاسمی با هفت دُمین فراغشایی (TM). دُمین متصل شونده به کالموجولین در ناحیه C- ترمینال (CaMBD) سازوکار پیام‌رسانی را در پاسخ دفاعی تنظیم می‌کند (Filiz and Vatansever 2018).

Fig 1. Predicted schematic model for MLO proteins. An extracellular N-terminal and a cytoplasmic C-terminal region with seven transmembrane (TM) domains. Calmodulin-binding domain in the C-terminal region (CaMBD) regulates the signaling mechanism in defense response.

Malus domestica L.) و سیب (*Triticum aestivum* L.) استفاده شد و پروتئین‌های *Mlo* شناسایی شده با توالی‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی با استفاده از رهیافت‌های بیوانفورماتیکی مورد بررسی و آنالیز قرار گرفتند. نتایج گزارش شده در اینجا ممکن است در طراحی مطالعات در زمینه پروفایل بیان ژن‌های *MdMlo* (*M. domestica Mlo*) و *TaMlo* (*T. aestivum Mlo*) مفید باشد، و یافته‌های این مطالعه می‌تواند در مطالعه مدیریتی سفیدک پودری سیب و گندم کمک نموده و در نهایت در توسعه جهش‌های ژن *Mlo* برای ایجاد مقاومت در برابر بیمارگرهای عامل سفیدک پودری مفید باشد.

مواد و روش‌ها

جستجو در بانک اطلاعات و فیلوژنی مقایسه‌ای

توالی پروتئینی مربوط به ۱۴ ژن *AtMlo* (*A. thaliana*) از *Mlo* (TAIR) The Arabidopsis Information Resource; <http://www.arabidopsis.org> دریافت گردید (Swarbreck et al. 2007). هر توالی پروتئینی

C- ترمینال از پروتئین‌های *Mlo* نیمی از توانایی آن‌ها برای تحریک حساسیت به بیمارگر سفیدک پودری جو را کاهش می‌دهد (Elliott et al. 2005b).

پروتئین‌های *MLO* پپتیدهای غنی از لوسین (۹ تا ۱۳ درصد) هستند (Singh et al. 2012) و طبق مطالعه‌های انجام شده پروتئین‌های غنی از لوسین نقش مهمی در مسیرهای انتقال پیام پاسخ دفاعی ایفا می‌کنند (Jung et al. 2004; Kędzierski et al. 2004; Torii 2004; Osakabe et al. 2005; Kemmerling et al. 2007). ایجاد جهش در ژن *SiMlo1* با تکنیک CRISPR-Cas9 باعث مقاومت به بیماری سفیدک پودری در گیاه گوجه فرنگی در یک سیستم غیر تراریخته شده است (Nekrasov et al. 2017). با توجه به مطالعات فوق از دست دادن عملکرد ژن‌های *MLO* یک استراتژی بالقوه جهت ایجاد مقاومت به سفیدک پودری در گونه‌های زراعی فراهم می‌کند. با این حال برای این مقصود، شناسایی ژن‌های *MLO* در گیاهان اساسی است.

در این مطالعه ژن‌های *A. thaliana Mlo* به عنوان مرجع برای یافتن اُرتولوگ‌ها در ژنوم گیاهان گندم نان

Plants (http://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Info/Index) برای شناسایی و تأیید ساختار ژن *Mlo* و موقعیت جایگاه‌های شروع رونویسی، موقعیت اگزونها و اینترون‌ها و دم‌های polyA در اعضای خانواده پروتئین *Mlo* این دو گونه استفاده شد. توالی‌های پروتئینی *Mlo* برای پروتئین‌های *TaMlo* و *MdMlo* با NCBI پیش‌بینی گردید و برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی استفاده شد. تجسم مرزهای بالادست و پایین‌دست^۵، CDS^۶، اگزون و اینترون با استفاده از برنامه نمایش ساختار ژن (GSDS; <http://gsds.cbi.pku.edu.cn>; Guo et al. 2007) و همچنین از طریق نرم‌افزار Ensembl Plants و NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) ایجاد گردید (شکل ۳).

دُمین‌های TM^۷ با استفاده از ابزار HMMTOP 2.0 (<http://www.enzim.hu/hmmtop>) (Tusnady and Simon 2001) شناسایی گردید و موقعیت‌یابی درون سلولی پروتئین‌های *Mlo* با استفاده از برنامه CELLO v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw>) (Yu et al. 2006) پیش‌بینی شد. وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌های *TaMlo* و *MdMlo* شناسایی شده و همچنین شاخص متوسط آبگریزی (GRAVY) آن‌ها برای نشان دادن مقدار آبگریزی پپتیدها با استفاده از Expasy مبتنی بر ابزار ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) (Gasteiger et al. 2005) محاسبه شد. وجود عناصر فعال سیس (cis) در ۱۰۰۰ جفت باز نواحی بالادست یعنی نواحی پروموتور ژن‌های *MdMlo* و *TaMlo* توسط برنامه

AtMlo به عنوان سوال تحقیق (query) برای جستجوی تشابه tBLASTn (Altschul et al. 1990) در پایگاه‌های داده توالی ژنوم گندم و سیب موجود در NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) استفاده گردید. توالی‌های پروتئینی با درصد همپوشانی (query coverage) بالاتر از ۵۰٪ و یکسانی (identity) بیشتر از ۴۰٪ (Deshmukh et al. 2016) به عنوان اعضای خانواده پروتئین *Mlo* در نظر گرفته شدند. سپس تمام توالی‌های پروتئینی بدست آمده برای حضور دُمین *Mlo* از طریق Pfam (<http://pfam.xfam.org>) (Punta et al.) و InterProScan (Quevillon et al. 2005) تایید شدند. یک انطباق توالی چندتایی از اعضای پروتئینی *TaMlo* و *MdMlo* با استفاده از ClustalW (Thompson et al. 1994) با حفظ پارامترهای پیش فرض انجام شد و نتایج هم‌ترازی توسط نرم‌افزار BioEdit (Hall 1999) بررسی شد. برای به دست آوردن درک بهتر از فیلوژنی تکاملی، درخت فیلوژنتیکی متشکل از ۲۹ عضو پروتئینی *Mlo* سیب و ۱۱ عضو پروتئینی *Mlo* گندم همراه با اعضای خانواده پروتئین *AtMlo* ساخته شد. از توالی پروتئین CoMlo متعلق به گیاه *Corchorus olitorius* L. با شماره دسترسی OMP09511 به عنوان گروه خارجی استفاده شد. درخت فیلوژنتیکی با برنامه MEGA6 با استفاده از روش برآورد حداکثر صرفه جویی (Maximum Parsimony=MP) با بوت‌استرپ براساس ۱۰۰۰ تکرار ساخته شد.

خصوصیات ژن‌های *Mlo*

از برنامه‌های آنلاین Fgenesh (<http://linux1.softber>) و AUGUSTUS (ry.com; <http://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/submission>)، GENSCAN (<http://gen>) و Ensembl (Burge and Karlin 1997) (es.mit.edu)

^۵ upstream and downstream

^۶ coding sequence

^۷ transmembrane

اندام‌های خاص منفرد مانند گل‌آذین بیان می‌شوند. توالی‌های ژنومی، کدکننده (CDS) و پروتئینی این همولوگ‌ها بازیابی شدند تا در تجزیه و تحلیل‌های بعدی مورد استفاده قرار گیرند. توالی‌های پروتئینی پروتئین‌های *TaMlo*، *MdMlo* و *AtMlo* برای انطباق توالی چندگانه و ساخت درخت فیلوژنتیکی توسط MP مورد استفاده قرار گرفت و از توالی پروتئین *CoMlo* متعلق به گیاه *C. olitorius* به عنوان گروه خارجی استفاده شد. درخت فیلوژنتیکی ساخته شده با استفاده از MP، پشتیبانی بوت‌استرپ نسبتاً قوی را نشان داد که بیانگر مقادیر بالایی از اطمینان است. درخت فیلوژنتیکی شامل سه خوشه اصلی بود (شکل ۲). خوشه III، خوشه اصلی و نسبت به دو خوشه دیگر طیف گسترده‌ای از توزیع فیلوژنتیک داشت، که نشان می‌دهد این پارالوگ‌ها ممکن است در عملکردهای اساسی مختلف سلولی نقش داشته باشند. از طرف دیگر، وقوع مضاعف شدن (duplication) در نواحی ژنومی که ژن‌های خوشه سه را در خود جای داده ممکن است بسیار بیشتر از نواحی ژنومی دارای ژن‌های خوشه‌های I و II باشد. در هر خوشه، روابط ژنتیکی بین توالی‌ها به طور کلی با فیلوژنی گونه‌های گیاهی سازگار بود یعنی دو پروتئین *MdMlo* با هم، دو پروتئین *TaMlo* با هم و دو پروتئین *AtMlo* با هم جفت‌های نزدیک به هم را تشکیل می‌دادند (شکل ۲) که این نشان می‌دهد پروتئین‌های *Mlo* هر خوشه به طور کلی در طول تکامل گیاهان حفظ می‌شوند. پروتئین‌های *MLO* آرابیدوپسیس شامل *AtMLO2*، 6 و 12 که برای مقاومت کامل در برابر PM ضروری‌اند (Consonni *et al.* 2006)، در نزدیک همدیگر و در یک خوشه همراه با پروتئین‌های *MdMlo2* و 6 در خوشه III قرار گرفتند. از این رو با استنتاج از پروتئین‌های *MLO* آرابیدوپسیس، پروتئین‌های *MdMlo2*

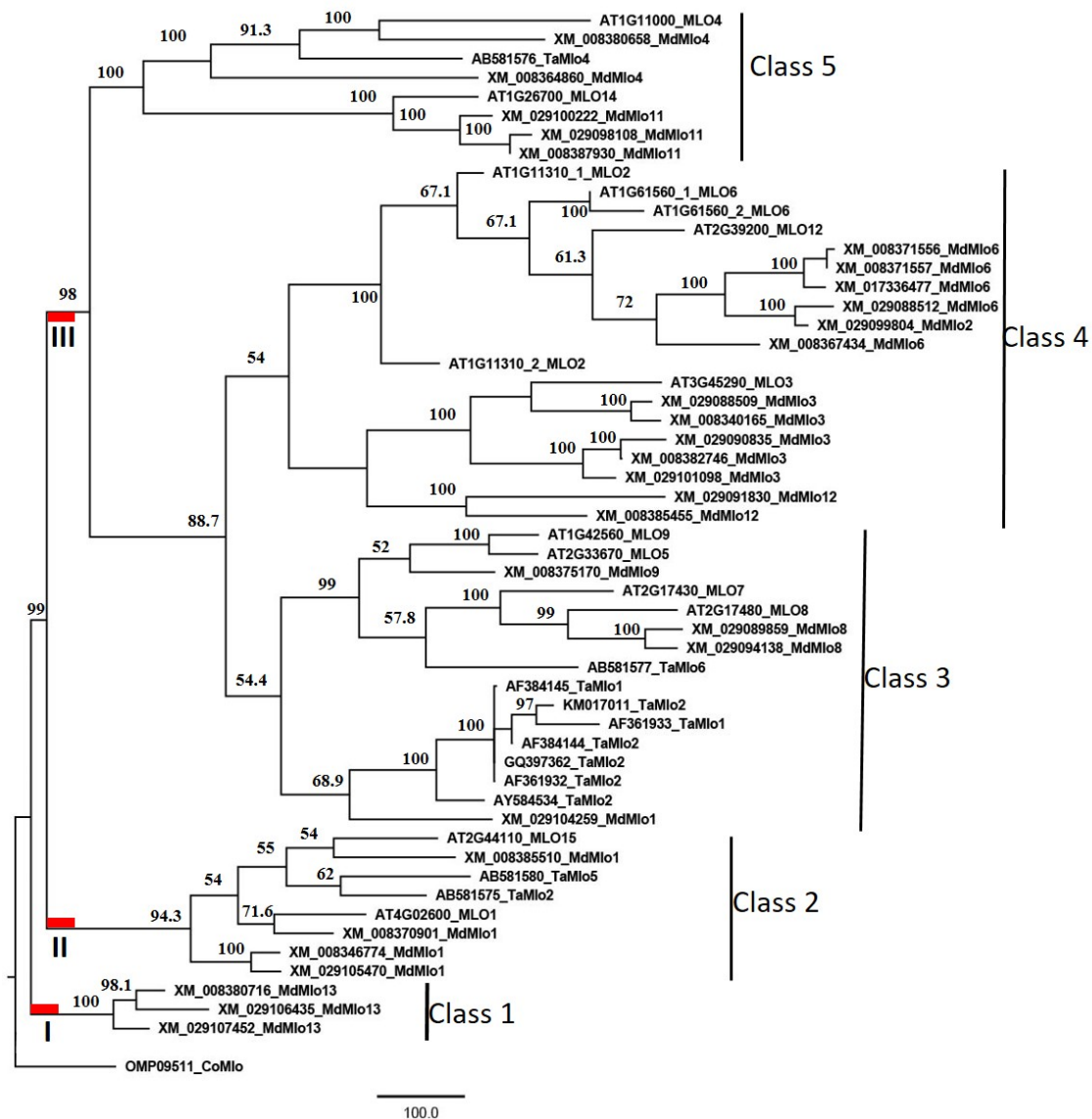
<http://bioinformatics.psb.ugent.be/> PlantCARE (webtools/plantcare) (Lescot *et al.* 2002) پیش‌بینی گردید. همچنین برای مطالعه تعامل پروتئین - پروتئین پروتئین‌های *MdMlo* و *TaMlo* از برنامه STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting) (Genes/Proteins database version 9.1) (Franceschini *et al.* 2012) استفاده گردید. موتیف‌های کارکردی محافظت شده موجود در پروتئین‌های *Mlo* با استفاده از ابزار MEME (<http://meme.nbcr.net>) (Bailey *et al.* 2006) با تنظیمات پهنای موتیف ۴۰-۲۵ و با حداکثر شماره موتیف ۴۰ بررسی گردید. تجزیه و تحلیل موتیف ترکیبی مقایسه‌ای برای اعضای پروتئینی *MdMlo*، *TaMlo* و *AtMlo* در ابعاد موتیف مشابه برای بازیابی موتیف‌های محافظت شده عمومی موجود در این سه گونه انجام شد.

نتایج

شناسایی ژن‌های *TaMlo* و *MdMlo* و روابط اُرتولوگ‌ها

جستجوی BLAST در سطح ژنوم با استفاده از پروتئین‌های *AtMlo* به عنوان سؤال تحقیق در برابر توالی‌های ژنوم گندم و سیب به ترتیب به جواب‌های (hits) ۱۱ و ۲۹ همولوگ منتج شد. گندم هگزاپلوئید است و نسبت به سیب که دیپلوئید است ژنوم بزرگتری دارد، در نتیجه باید دارای تعداد بیشتری عضو پروتئینی *Mlo* باشد. احتمالاً دلیل اینکه ما در این تحقیق یازده عضو پروتئینی *Mlo* را ردیابی کردیم این است که همه اعضای خانواده پروتئین *Mlo* در گندم به طور مداوم بیان نمی‌شوند. چن و همکاران (Chen *et al.* 2006) نشان دادند که برخی از اعضای خانواده پروتئین *Mlo* در آرابیدوپسیس فقط در

و 6 سیب به عنوان نامزدهای بالقوه دخیل در مقاومت به ترکیبی، پروتئین‌های MdMlo و AtMlo بطور کلی ارتباط سفیدک پودری سیب در نظر گرفته می‌شوند. در درخت



شکل ۲. طبقه‌بندی فیلوژنتیکی مبتنی بر توالی‌های اسیدآمینه ۲۹ پروتئین *Malus domestica* Mlo و ۱۱ پروتئین *Triticum Mlo* به همراه ۱۴ پروتئین *Arabidopsis thaliana* Mlo که با MEGA6 توسط روش برآورد حداکثر صرفه جویی با بوت‌استرپ براساس ۱۰۰۰ تکرار ایجاد گردید. از توالی پروتئین CoMlo متعلق به گیاه *Corchorus olitorius* با شماره دسترسی OMP09511 به عنوان گروه خارجی استفاده شد. الگوی خوشه‌بندی سه خوشه اصلی و پنج زیر خوشه (گروه) را نشان داد.

Fig 2. Phylogenetic classification based on amino acid sequences of 29 *Malus domestica* Mlo and 11 *Triticum aestivum* Mlo in combination with 14 *Arabidopsis thaliana* Mlo proteins was constructed using maximum parsimony estimation by MEGA 6.0 software with 1000 bootstrap replications. The bootstrap support is indicated at each node. CoMlo protein sequence belonging to *Corchorus olitorius* with accession number OMP09511 was used as an out group. The clustering pattern showed three main clusters and five sub-clusters (classes).

Ensembl Plants و NCBI ترتیب متغیر اگزون‌ها و اینترون‌ها را در ژن‌های *TaMlo* و *MdMlo* نشان داد (شکل ۳)، اما تعداد اگزون‌ها خیلی متفاوت نبود. این حفاظت در بین ژن‌های *Mlo* سویا، آرابیدوپسیس، برنج، گندم و سورگوم نیز مشاهده شده است (Liu and Zhu 2008; Konishi et al. 2010; Singh et al. 2012). کروموزوم 4B گندم پنج عضو ژنی *TaMlo* و کروموزوم‌های 5A، 1B و 2D هر کدام دو عضو داشتند (جدول ۱، شکل ۵). کروموزوم‌های ۲، ۳ و ۸ سیب هر کدام چهار عضو ژنی *MdMlo*، کروموزوم‌های ۶، ۷ و ۱۱ هر یک دو عضو، کروموزوم‌های ۴ و ۱۲ هر کدام سه عضو و کروموزوم‌های ۱۰، ۱۳ و ۱۵ هر یک تنها یک عضو از خانواده ژن *MdMlo* را به همراه داشتند در حالی که کروموزوم‌های ۱، ۵، ۹، ۱۴، ۱۶ و ۱۷ دارای هیچ ژن *MdMlo* نبودند (جدول ۲).

مطالعه موقعیت‌شناسی پروتئین‌های *MdMlo* و *TaMlo* از طریق نرم‌افزار HMMTOP 2.0، ۱۰-۵ دمین TM را پیش‌بینی کرد (جدول ۳). موقعیت‌یابی درون سلولی پروتئین‌های *MdMlo* و *TaMlo* پیش‌بینی شده از طریق CELLO نشان داد که آن‌ها در غشای پلاسمایی به عنوان پروتئین‌های غشایی درونی یا سرتاسری^۸ قرار دارند. تجزیه و تحلیل ترکیب اسیدآمینه نشان داد که بسیاری از پروتئین‌های *MdMlo* و *TaMlo* غنی از لوسین و سرین هستند (جدول ۳). وزن مولکولی پروتئین‌های *MdMlo* در محدوده‌ی 46105.93 تا 68789.55 دالتون بود درحالی‌که در مورد پروتئین‌های *TaMlo* از 47183.05 تا 63301.07 دالتون متغیر بود (جدول ۳).

شاخص متوسط آبگریزی (GRAVY) برای نشان دادن

نزدیکتری را با یکدیگر نشان دادند، در حالی که پروتئین‌های *TaMlo* واگرایی بیشتری را از آن‌ها نشان دادند که این با تک‌لپه‌ای بودن این و دولپه‌ای بودن آن‌ها سازگار است. خوشه اول شامل توالی پروتئین‌های *MdMlo13* بود. طول بزرگی از کروموزوم‌های سیب در کروموزوم‌های دیگر کمی می‌شوند. این مضاعف شدن توضیح می‌دهد که چرا ژنوم سیب دارای ۱۷ کروموزوم است در حالی که تمام گیاهان دیگر در خانواده Rosaceae (از جمله هلو، تمشک و توت فرنگی) بین ۷ تا ۹ کروموزوم دارند (Velasco et al. 2010). از این رو، آلگوی گروه‌بندی ابتدایی پروتئین‌های *MdMlo13* با وقوع رویداد مضاعف شدن ژنوم در سیب پس از واگرایی آن از گندم و آرابیدوپسیس سازگار است.

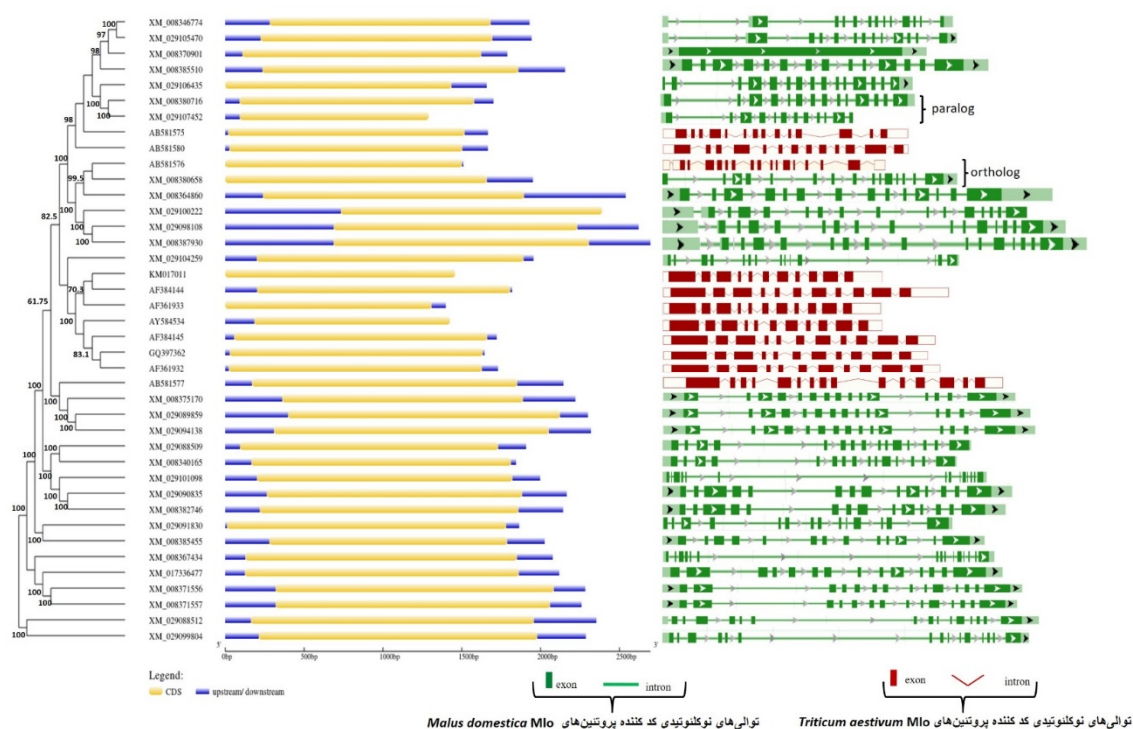
ساختار ژن‌ها، موقعیت‌شناسی پروتئین‌ها و نقش احتمالی

پروتئین‌های *MdMlo* و *TaMlo*

مطالعه ساختار ژن از طریق برنامه‌های Fgenesh، Ensembl، AUGUSTUS و GENSCAN نشان داد که ژن‌های *Mlo* اغلب در مورد سیب ۱۴ اگزون کدکننده پپتیدهای 398-597 اسیدآمینه با مقدار نقطه ایزوالکتریک pI 6.69-9.57 و در مورد گندم ۱۱ اگزون کدکننده پپتیدهای 413-560 اسیدآمینه با مقدار نقطه ایزوالکتریک pI 8.79-9.72 دارند (جدول ۱، ۲ و ۳). طول نوکلئوتید در پروتئین‌های *Mlo* سیب از ۱۲۸۹ جفت باز (*MdMlo13*) تا ۲۶۹۶ جفت باز متغیر بود (*MdMlo11*؛ جدول ۲). به طور مشابه، طول نوکلئوتید در مورد پروتئین‌های *TaMlo* از ۱۳۹۹ جفت باز (*TaMlo1*) تا ۲۱۴۵ جفت باز متغیر بود (*TaMlo6*؛ جدول ۱). به طور متوسط، به نظر می‌رسد که ژن‌های *TaMlo* کوتاه‌تر از ژن‌های آرئولوگ *MdMlo* هستند. ساختار ژن تجسم شده از طریق GSDS.

^۸ integral membrane proteins

مقدار آبگریزی پپتیدها با استفاده از ابزار ProtParam تعیین گردید. معیار Gravy یک پروتئین از طریق تقسیم مجموع میزان آبگریزی تمام اسیدهای آمینه بر تعداد اسیدهای آمینه موجود در توالی محاسبه می‌شود (Kyte and Doolittle)



شکل ۳. طبقه‌بندی فیلوژنتیکی بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی کد کننده پروتئین‌های *Malus domestica* Mlo و *Triticum aestivum* Mlo که توسط MEGA6 با روش برآورد حداکثر صرفه جویی با بوت‌استرپ ۱۰۰۰ تکرار ایجاد گردید. سازمان ژن (موقعیت اگزون‌ها، اینترون‌ها، CDS و بالادست و پایین دست) از طریق ابزارهای GSDS، Ensembl Plants و NCBI بدست آمد.

Fig 3. Phylogenetic classification based on the nucleotide sequences encoding *Malus domestica* Mlo and *Triticum aestivum* Mlo proteins was constructed using maximum parsimony estimation by MEGA 6.0 software with 1000 bootstrap replications. The gene organization (the visualization of exons, introns, CDS and upstream/downstream) was visualized through NCBI, GSDS and Ensembl Plants tools.

جدول ۱. مشخصات اعضای خانواده ژن *Mlo* شناسایی شده در *Triticum aestivum*.

Table 1. The characteristics of the identified *Mlo* gene family members in *Triticum aestivum*.

Accession number	Gene	Chromosome number	Nucleotide length (bp)	Amino acids	Exons	Domain	Product
AB581576.1	<i>TaMlo4</i>	4B	1510	499	15	Mlo family	seven trans-membrane protein
AF384145.1	<i>TaMlo1</i>	4B	1721	534	11	Mlo family	MLO1 protein
KM017011.1	<i>TaMlo2</i>	5A	1457	486	11	Mlo family	MLO
GQ397362.1	<i>TaMlo2</i>	4B	1644	534	11	Mlo family	Mlo protein
AF384144.1	<i>TaMlo2</i>	2D	1819	534	11	Mlo family	MLO protein
AB581580.1	<i>TaMlo5</i>	2D	1666	492	13	Mlo family	seven trans-membrane protein
AB581575.1	<i>TaMlo2</i>	1B	1666	499	14	Mlo family	seven trans-membrane protein
AF361933.1	<i>TaMlo1</i>	5A	1399	435	11	Mlo family	seven transmembrane-spanning protein
AB581577.1	<i>TaMlo6</i>	1B	2145	560	15	Mlo family	seven trans-membrane protein
AY584534.1	<i>TaMlo2</i>	4B	1424	413	11	Mlo family	Mlo protein
AF361932.1	<i>TaMlo2</i>	4B	1730	534	11	Mlo family	seven transmembrane-spanning protein

جدول ۲. مشخصات اعضای خانواده ژن *Mlo* شناسایی شده در *Malus domestica*.

Table 2. The characteristics of the identified *Mlo* gene family members in *Malus domestica*.

Accession number	Gene	Chromosome number	Nucleotide length (bp)	Amino acids	Exons	Domain	Product
XM-008380658.3	<i>MdMlo4</i>	8	1951	552	15	Mlo family	MLO-like protein 4
XM-008364860.3	<i>MdMlo4</i>	2	2540	551	14	Mlo family	MLO-like protein 4
XM-029100222.1	<i>MdMlo11</i>	3	2389	551	15	Mlo family	MLO-like protein 11
XM-008380716.3	<i>MdMlo13</i>	8	1701	495	14	Mlo family	MLO-like protein 13 isoform X1
XM-008346774.2	<i>MdMlo1</i>	2	1930	466	13	Mlo family	MLO-like protein 1 isoform X1
XM-029105470.1	<i>MdMlo1</i>	7	1943	489	13	Mlo family	MLO-like protein 1
XM-008385510.3	<i>MdMlo1</i>	2	2155	540	14	Mlo family	MLO-like protein 1
XM-008370901.3	<i>MdMlo1</i>	3	1789	504	1	Mlo family	MLO-like protein 1
XM-029091830.1	<i>MdMlo12</i>	13	1864	589	14	Mlo family	MLO-like protein 12
XM-029090835.1	<i>MdMlo3</i>	12	2166	539	14	Mlo family	MLO-like protein 3 isoform X2
XM-008375170.3	<i>MdMlo9</i>	6	2220	508	15	Mlo family	MLO-like protein 9
XM-008385455.3	<i>MdMlo12</i>	10	2026	502	13	Mlo family	MLO-like protein 12
XM-029088509.1	<i>MdMlo3</i>	11	1908	545	15	Mlo family	MLO-like protein 3
XM-029089859.1	<i>MdMlo8</i>	2	2300	574	15	Mlo family	MLO-like protein 8
XM-029101098.1	<i>MdMlo3</i>	4	1997	539	14	Mlo family	MLO-like protein 3
XM-029094138.1	<i>MdMlo8</i>	15	2319	580	15	Mlo family	MLO-like protein 8
XM-008382746.3	<i>MdMlo3</i>	12	2143	546	14	Mlo family	MLO-like protein 3 isoform X1
XM-008340165.3	<i>MdMlo3</i>	3	1844	548	15	Mlo family	MLO-like protein 3
XM-029104259.1	<i>MdMlo1</i>	6	1955	563	14	Mlo family	MLO protein homolog 1-like
XM-008371556.3	<i>MdMlo6</i>	4	2283	587	14	Mlo family	MLO-like protein 6 isoform X1
XM-008371557.3	<i>MdMlo6</i>	4	2259	579	14	Mlo family	MLO-like protein 6 isoform X2
XM-017336477.2	<i>MdMlo6</i>	12	2118	578	14	Mlo family	MLO-like protein 6
XM-029088512.1	<i>MdMlo6</i>	11	2354	597	15	Mlo family	MLO-like protein 6
XM-029099804.1	<i>MdMlo2</i>	3	2287	588	15	Mlo family	MLO-like protein 2
XM-008367434.3	<i>MdMlo6</i>	7	2077	573	15	Mlo family	MLO-like protein 6
XM-029107452.1	<i>MdMlo13</i>	8	1289	398	12	Mlo family	MLO-like protein 13 isoform X2
XM-029098108.1	<i>MdMlo11</i>	-	2622	514	17	Mlo family	MLO-like protein 11 isoform X3
XM-008387930.3	<i>MdMlo11</i>	-	2696	539	17	Mlo family	MLO-like protein 11 isoform X1
XM-029106435.1	<i>MdMlo13</i>	8	1658	477	15	Mlo family	MLO-like protein 13

آلفاتیک بالا از نظر حرارتی پایدار هستند. اسیدهای آمینه آلفاتیک همچنین از لحاظ ماهیت آبگریز هستند. شاخص آلفاتیک سیتوتوکسین‌ها (cytotoxins) در دامنه ۶۶/۵ تا ۸۴/۳۳ نشان داد که این پروتئین‌ها از نظر حرارتی پایدار هستند و همچنین حاوی مقدار زیادی اسیدهای آمینه آبگریز هستند (Panda and Chandra 2012).

وجود عناصر فعال cis مختلف در ناحیه تنظیمی هر ژن، نقش مهمی در پاسخ ژن به محرک‌های محیطی و زیستی و کنترل بیان مکانی و زمانی ژن‌ها دارد، بنابراین بررسی این عناصر فعال cis دخیل در بیان ژن‌ها در ناحیه

(1982). شاخص GRAVY پروتئین‌ها بین اعداد مثبت و منفی متغیر است. چنانچه این شاخص منفی باشد پروتئین دارای خاصیت آب‌دوستی است و اگر بالاتر از صفر و مثبت باشد نشان می‌دهد که پروتئین مورد نظر دارای خاصیت آبگریزی می‌باشد. مقادیر GRAVY نشان داد که خانواده پروتئین *Mlo* از اعضای آبگریز و آب‌دوست تشکیل شده است که به دلیل موقعیت فراغشایی آن‌ها می‌توان این انتظار را داشت. نرخ شاخص آلفاتیک پروتئین‌های *MdMlo* و *TaMlo* بالا و در محدوده ۸۳/۴ تا ۱۰۷/۲ بود (جدول ۳). پروتئین‌های دارای شاخص

جدول ۳. ویژگی پپتیدهای خانواده ژنی *Mlo* در *Malus domestica* و *Triticum aestivum*.

Table 3. The characteristics of the peptides *Mlo* gene family in *Malus domestica* and *Triticum aestivum*.

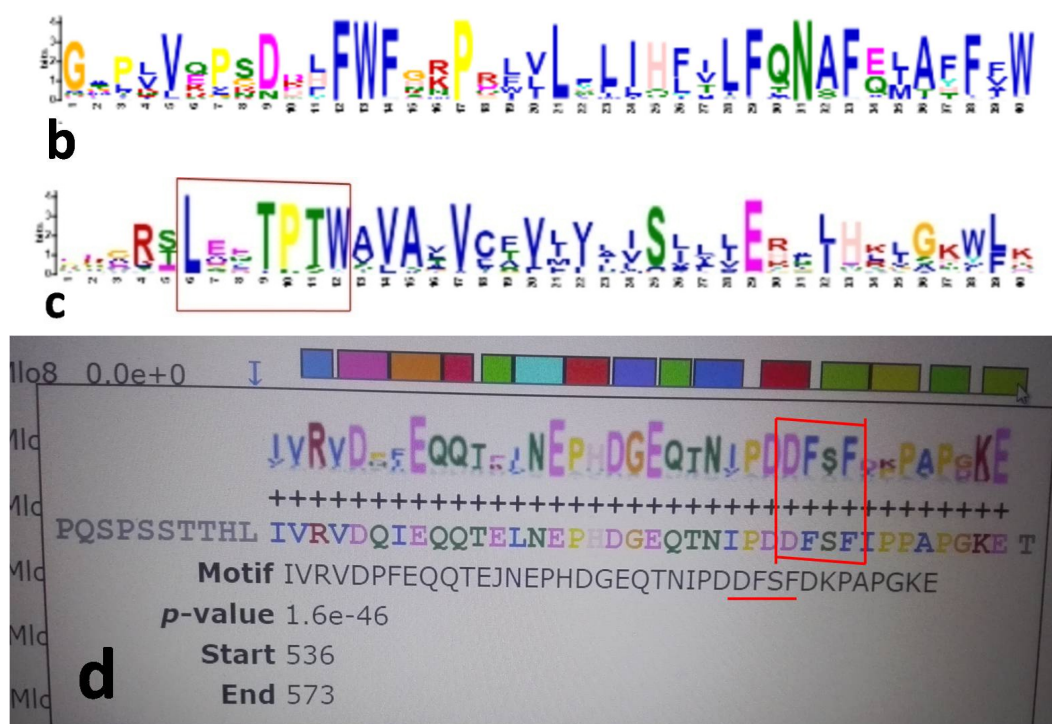
Accession number	Gravy	Aliphatic index	Molecular weight	Theoretical PI*	TM** domains	Amino acid rich
XM-008380658.3	-0.048	93.21	63276.32	8.40	7	Leu 11.4%
XM-008364860.3	-0.026	91.74	63557.44	8.22	7	Leu 10.7%
XM-029100222.1	-0.009	92.54	63376.42	9.26	7	Leu 10.9%
XM-008380716.3	0.035	100.40	56915.04	8.91	8	Leu 12.5%
XM-008346774.2	0.280	102.90	53479.18	9.36	9	Leu 10.9%
XM-029105470.1	0.201	99.22	55499.32	9.52	9	Leu 9.8%
XM-008385510.3	0.184	100.04	60661.76	9.35	7	Leu 11.3%
XM-008370901.3	0.187	101.15	57453.40	8.93	9	Leu 10.7%
XM-029091830.1	0.041	96.93	67237.79	8.25	7	Leu 10.9%
XM-029090835.1	-0.099	93.14	62184.91	8.89	6	Leu 10.4%
XM-008375170.3	0.139	97.13	57100.75	9.10	7	Leu 11.0%
XM-008385455.3	0.112	94.98	57369.58	9.04	7	Leu 12.4%
XM-029088509.1	0.006	93.52	62384.07	8.74	8	Leu 9.9%
XM-029089859.1	0.111	98.01	65142.72	8.93	10	Leu 11.7%
XM-029101098.1	0.023	94.21	62335.40	9.05	7	Leu 10.2%
XM-029094138.1	0.074	94.98	65668.37	9.15	10	Leu 11.2%
XM-008382746.3	-0.026	94.98	62988.04	8.97	7	Leu 10.3%
XM-008340165.3	0.033	92.45	62653.26	8.08	8	Leu 8.9%
XM-029104259.1	-0.049	87.16	63760.94	9.51	7	Leu 10.1%
XM-008371556.3	-0.043	93.00	66727.31	9.43	7	Leu 11.2%
XM-008371557.3	-0.063	92.44	65890.28	9.39	7	Leu 11.1%
XM-017336477.2	-0.015	95.81	65722.57	9.57	7	Leu 10.9%
XM-029088512.1	-0.110	90.59	68789.55	9.18	9	Leu 9.0%
XM-029099804.1	-0.110	90.66	67880.77	9.52	9	Leu 9.4%
XM-008367434.3	-0.088	88.24	65476.61	9.43	7	Leu 9.8%
XM-029107452.1	0.167	107.26	46105.93	9.17	7	Leu 13.8%
XM-029098108.1	-0.052	95.25	58759.75	6.69	7	Leu 11.1%
XM-008387930.3	-0.032	94.45	61795.37	7.62	7	Leu 10.9%
XM-029106435.1	0.202	105.83	55197.49	7.71	8	Leu 12.2%
AB581576.1	0.106	98.64	57481.36	8.79	7	Leu 12.2%
AF384145.1	0.097	93.67	60402.88	9.54	7	Leu 10.1%
KM017011.1	0.089	94.28	55287.06	9.72	7	Leu 10.3%
GQ397362.1	0.110	93.67	60423.89	9.49	7	Leu 10.1%
AF384144.1	0.107	93.13	60298.71	9.53	7	Leu 9.9%
AB581580.1	0.218	102.01	55853.05	9.59	7	Leu 11.6%
AB581575.1	0.241	105.11	56247.16	9.15	7	Leu 11.2%
AF361933.1	0.038	88.74	49354.57	9.57	5	Leu 9.4%
AB581577.1	-0.094	83.43	63301.07	9.48	7	Ser 8.8%
AY584534.1	0.376	105.04	47183.05	9.47	7	Leu 11.6%
	0.109	92.94	60427.88	9.49	7	Leu 9.9%

*: isoelectric point; **: transmembrane

پروموتور ژن‌های *MLO*، برای کسب بینش در مورد الگوی بیان شدن و عملکرد این ژن‌ها در شرایط زیستی بسیار کاربردی است (Liu et al. 2014). تجزیه و تحلیل ۱۰۰۰ جفت باز نواحی بالادست ژن‌های *MdMlo* و *TaMlo*، عناصر پاسخ به محرک زیر را شناسایی کرد که عمده عناصر تنظیمی ردیابی شده مرتبط با پاسخ به هورمون‌ها و تنش‌ها (چه زنده و چه غیرزنده) بود: (الف) عناصر تنظیمی دخیل در رشد و نمو: GCN4-



a

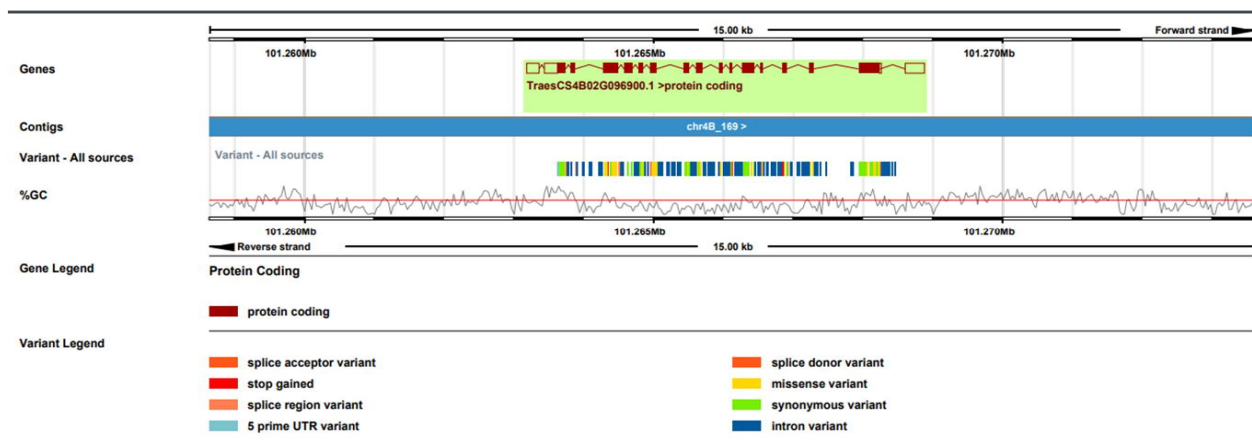


شکل ۴. تعیین موتیف‌های محافظت شده. a. یک نمودار بلوک ترکیبی از موتیف‌های حفاظت شده پروتئینی Mlo (۲۹ عضو *Malus domestica*، ۱۱ عضو *Triticum aestivum* و ۱۴ عضو *Arabidopsis thaliana*) با پهنای ۲۵-۴۰ اسید آمینه، بدست آمده با نرم‌افزار تحت وب MEME. b. موتیف ۱ بطور یکنواخت و بسیار محافظت شده در تمام پروتئین‌های Mlo. c. موتیف ۸ موجود در دُمین TM1 پروتئین‌های Mlo *Malus domestica* و *Triticum aestivum* که دارای توالی محافظت شده LEETPTW است. d. توالی محافظت شده DFSF در ناحیه C-ترمینال پروتئین Mlo8 *Malus domestica* که در مقاومت برابر سفیدک پودری درگیر است.

Fig 4. Determination of conserved motifs. a. A combined block diagram of conserved motifs of Mlo proteins (including 29 *Malus domestica*, 11 *Triticum aestivum* and 14 *Arabidopsis thaliana*) at a width of 25–40 amino acids obtained through MEME suite. b. The highly conserved motif 1 of Mlo proteins. c. The motif block 8 present in TM1 domain of the *Malus domestica* Mlo and *Triticum aestivum* Mlo proteins showing the LEETPTW consensus sequence. d. The DFSF conserved sequence in the C-terminal region of the *Malus domestica* Mlo8 protein involved in powdery mildew resistance.

زنده: MBS (عنصر تنظیمی درگیر در پاسخ به تنش به خشکی)، ARE (عنصر تنظیمی ضروری برای شرایط کمبود اکسیژن) و G-box، GT1-motif، Sp1، TCT-motif و LAMP-element (عناصر تنظیمی پاسخ دهنده به نور)
(د) عناصر تنظیمی مربوط به پاسخ به الیسیاتور قارچی: AT-rich و Box-W1
بررسی تعامل پروتئینی تک تک پروتئین‌های Mdmlo و

motif (عنصر فعال cis دخیل در بیان اندوسپرم)، MSA-like (دخیل در تنظیم چرخه سلولی) و CAT-box (عنصر دخیل در بیان مریستم)
(ب) عناصر تنظیمی مربوط به پاسخ به هورمون‌ها: ABRE (عنصر فعال cis دخیل در پاسخ به آبسازیک اسید)، P-box (عنصر پاسخ به جیبرلین)، TGA-element (عنصر پاسخ به اکسین)
(ج) عناصر تنظیمی مربوط به پاسخ به تنش‌های غیر



شکل ۵. جایگاه، خصوصیات و سازماندهی ژن *TaMlo4* (*Triticum aestivum Mlo4*) (accession: AB581576) بر روی کروموزوم 4B رشته forward گندم (*T. aestivum*) که در محدوده ۱۰۱/۲۶۳-۱۰۱/۲۶۹ مگا جفت باز قرار دارد. بدست آمده با نرم افزار Ensembl Plants

Fig 5. Position, characteristics and organization of the *Triticum aestivum Mlo4* gene (accession: AB581576) on the chromosome 4B of the *T. aestivum* forward strand, located in the 101. 263-101. 269 Mb range. Obtained with Ensembl Plants software.

AtMlo با توجه به همولوژی آنها با پروتئین‌های TaMlo استفاده شد. بیشتر پروتئین‌های TaMlo و MdMlo (جدول ۴) با استفاده از نرم‌افزار STRING v 9.1 مورد مطالعه قرار گرفت. از پروتئین‌های همولوگ AtMlo دارای بالاترین امتیاز (score) برای بررسی تعامل و برهمکنش استفاده شد. برهمکنش‌های مشابه را با پروتئین‌های AtMlo 1، 2، 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 12 و 15 نشان دادند (شکل ۶). شناسایی موتیف‌های محافظت شده از طریق ابزار

جدول ۴: مشخصات پروتئین‌های *Arabidopsis thaliana Mlo* همولوگ با پروتئین‌های *Malus domestica Mlo* و *Triticum aestivum Mlo*

Table 4. The characteristics of *Arabidopsis thaliana Mlo* proteins homologous with *Malus domestica Mlo* and *Triticum aestivum Mlo* proteins.

Accession number	TAIR*	Amino acids	Molecular weight	gene	Aliphatic index	Theoretical PI**
NP_001320916	AT1G11000	573	65465.59	MLO4	90.82	8.37
NP_001319086	AT1G26700	554	63923.01	MLO14	97.45	8.78
NP_001320358	AT1G11310.1	511	58392.32	MLO2	86.58	9.47
NP_001117268	AT1G11310.2	418	48139.44	MLO2	101.17	9.39
NP_001319285	AT1G61560.1	583	67083.00	MLO6	92.61	9.53
NP_565902	AT2G39200	576	66548.04	MLO12	89.36	9.07
NP_566879	AT3G45290	508	58562.50	MLO3	93.98	7.20
NP_174980	AT1G42560	460	53209.66	MLO9	98.28	9.25
NP_180923	AT2G33670	501	56896.46	MLO5	94.95	9.20
NP_001185283	AT1G61560.2	521	60140.55	MLO6	86.79	9.59
NP_179335	AT2G17430	542	62111.85	MLO7	101.68	9.32
NP_565416	AT2G17480	593	67212.27	MLO8	92.36	9.24
NP_181939	AT2G44110	496	56150.88	MLO15	103.95	9.10
NP_001031578	AT4G02600	526	59125.90	MLO1	100.97	8.71

*: The Arabidopsis Information Resource; **: isoelectric point

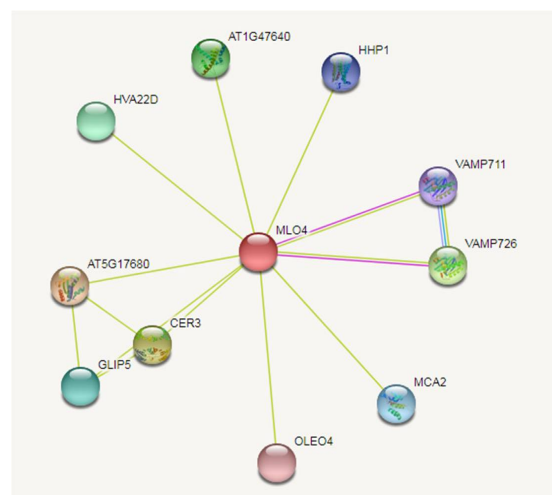
موتیف حفاظت شده در پروتئین‌های Mlo سیب، گندم و آرابیدوپسیس نشان داد (شکل ۴a) و مشخص کرد که موتیف‌های GAPLVQPSDDLFWFGRPRLVLFLIH و FILFQNAFZLAFFFW و GLHQLHIFIFVLAVFH و VLYSVJTMALGRAKMRRWKKWEDE بسیار محافظت شده هستند و در تمام توالی‌های پروتئینی MLO مشترک هستند (شکل ۴b). موتیف ۸ دارای یک توالی مشترک بسیار محافظت شده در ژن TM-1 بود (شکل ۴c). این توالی همچنین در پروتئین‌های Mlo سویا، آرابیدوپسیس، گندم، ذرت، لوبیا، *Cajanus cajan* و برنج محافظت شده است و مشخص شده است که منحصراً در پروتئین‌های Mlo وجود دارد. (Elliott et al. 2005a; Shen et al. 2012; Deshmukh et al. 2016). اسیدآمین L در تمام پروتئین‌های Mlo کاملاً محافظت شده بود ولی اسیدآمین‌های T، P، T و W فقط به ترتیب در ۲ (I جایگزین T شده بود)، ۳ (S جایگزین P شده بود)، ۴ (S جایگزین T شده بود) و ۲ (Y جایگزین W شده بود) پروتئین Mlo جابه‌جا شده بودند. در مقابل، اسیدآمین‌های EE بسیار کمتر محافظت شده بودند و تعداد کمی از وقوع جابه‌جایی در آنها بر ساختار پروتئین تأثیر می‌گذارد.

بحث

تجزیه و تحلیل توالی و روابط فیلوژنتیک پروتئین‌های

AtMlo و TaMlo، MdMlo

خانواده ژنی *Mlo* به دلیل حضور فراگیرشان در گیاهان عالی و طبقه بندی آنها در خانواده ژنی مرتبط با دفاع گیاه اخیراً اهمیت زیادی پیدا کرده‌اند. ژن‌های *Mlo* بدون آنکه توسط عمل متقابل بیمارگر سفیدک پودری بی‌اثر شوند، مقاومت پایداری را در جو تامین می‌کنند (Atzema 1998). در درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده، اعضای Mlo



شکل ۶. تعامل پروتئین *Arabidopsis thaliana* Mlo4 با شماره دسترسی AT1G11000 (یکی از پروتئین‌های MLO آرابیدوپسیس تالیانا همولوگ با پروتئین‌های *Malus domestica* و *Triticum aestivum* و *domestica* (Vesicle-associated membrane protein 711) و ۷۲۶، seven Heptahelical transmembrane protein 1، HVA22-like protein، transmembrane domain protein، d، Fatty acid hydroxylase superfamily، GDSL، Protein، Disease resistance protein، esterase/lipase 5، MID1-COMPLEMENTING ACTIVITY 2 و Oleosin 20.3 kDa) درگیر در مسیر دفاعی. بدست آمده با برنامه STRING v 9.

Fig 6. Interaction of *Arabidopsis thaliana* Mlo4 Protein with Accession Number AT1G11000 (one of the MLO proteins of *Arabidopsis thaliana* homolog with *Malus domestica* and *Triticum aestivum* Mlo proteins) with a variety of other proteins (Vesicle-associated membrane protein 711 and 726, Heptahelical transmembrane protein 1, seven transmembrane domain protein, HVA22-like protein d, Fatty acid hydroxylase superfamily, GDSL esterase/lipase 5, Disease resistance protein, Protein MID1-COMPLEMENTING ACTIVITY 2 and Oleosin 20.3 kDa) involved in the defense pathway. Obtained with the STRING v 9 program.

MEME با پارامترهای کمترین و بیشترین پهنای موتیف ۲۵ و ۴۰ و با حداکثر شماره موتیف ۴۰ برای پروتئین‌های AtMlo و TaMlo، MdMlo، حداکثر ۱۵ و حداقل ۱۰

گیاهان (گندم، سیب و آرابیدوپسیس) به پنج گروه تقسیم شدند. سه گروه از آن‌ها شامل اعضای هر دو گیاهان تک‌لپه و دولپه بودند (شکل ۲). این نشان می‌دهد که تشکیل گروه‌های Mlo قبل از واگرایی گیاهان تک‌لپه و دولپه بوده است. در هر گروه، روابط ژنتیکی بین توالی‌ها به طور کلی با فیلوژنی گونه‌های گیاهی سازگار بود. به عنوان مثال، پروتئین‌های Mlo سیب به پروتئین‌های Mlo آرابیدوپسیس، نسبت به پروتئین‌های Mlo گندم در هر گروه نزدیکتر بودند. سطح تشابه توالی و روابط فیلوژنتیک بین پروتئین‌های Mlo گیاهان نشان داد که پروتئین‌های Mlo گندم شناسایی شده علی‌رغم ماهیت هگزاپلوئید گندم، با یکدیگر homoeologous نبودند. در کلاس پنجم، یک پروتئین Mlo گندم با دو پروتئین Mlo سیب و یک پروتئین Mlo آرابیدوپسیس در یک خوشه قرار گرفت. این نتیجه ممکن است به دلیل تفاوت در نرخ تکاملی در بین لوکوس‌های homoeologous ایجاد شده باشد. از آنجا که خوشه III گستردگی بیشتری داشت و شامل پروتئین‌های Mlo سیب، گندم و آرابیدوپسیس بود، ممکن است به عنوان محافظت شده‌ترین گروه خانواده پروتئین Mlo با اهمیت عملکردی در گیاهان در نظر گرفته شود.

در هر گروه تعداد متنوعی از اعضای Mlo از یک گونه واحد وجود داشت. به عنوان مثال در گروه پنجم، دو پروتئین Mlo آرابیدوپسیس و یک پروتئین Mlo گندم وجود داشت. در گروه چهارم، پنج پروتئین Mlo آرابیدوپسیس وجود داشت در حالی که عضوی از گندم وجود نداشت. هشت عضو از یازده پروتئین Mlo گندم در گروه سوم وجود داشت، تعداد نسبتاً بیشتری از پروتئین‌های گروه سه متعلق به گندم و همچنین برنج و ذرت (Liu and Zhu 2008; Konishi et al. 2010) است که این نشانگر وقوع یک افزایش در پروتئین‌های گروه

سوم از تک‌لپه‌ها یا خط‌نسل گندمیان (Gramineae lineage) است.

آنالیز درخت فیلوژنتیکی نشان داد که صرف‌نظر از نوع گونه‌ی گیاهی، Mlo1، Mlo2، Mlo3، Mlo4، Mlo6، Mlo7 و ... هرکدام به صورت گروهی، بسیار نزدیک همدیگر قرار گرفتند که این بیان می‌کند که اُرتولوگ‌های خانواده ژنی *MdMlo*، *TaMlo* و *AtMlo* از توالی‌های اجدادی مشترک تکامل یافته‌اند و اینکه گندم، سیب و آرابیدوپسیس مدتی پس از آخرین واقعه گسترش خانواده ژن *Mlo* در گونه‌های اجدادی اشتقاق یافتند. در آرابیدوپسیس و گندم الگوهای بیان ژن‌های *Mlo* در اندام خاص این دو گیاه با روابط فیلوژنتیک بین پروتئین‌های *Mlo* مطابقت ندارد (Chen et al. 2006; Konishi et al. 2010). این واقعیت نشان می‌دهد که تمایز الگوهای بیان گروه‌های خانواده پروتئینی *Mlo* پس از اشتقاق آن‌ها رخ داده است و بیان در اندام خاص در گونه‌های مربوطه به طور مستقل توسعه یافته است (Konishi et al. 2010).

توالی‌های اسید آمینه ۷ دُمین TM در پروتئین‌های *Mlo* گندم (*TaMlo*)، سیب (*MdMlo*)، آرابیدوپسیس (*AtMlo*)، برنج (*OsMlo*)، سورگوم (*SbMlo*)، سویا (*GmMlo*) و لوبیا (*PvMlo*) (Deshmukh et al. 2016) نسبت به نواحی بین TM‌ها، حفاظت خیلی بیشتری از خود نشان دادند که نشان می‌دهد که توالی‌های TM برای عملکرد پروتئین *Mlo* ضروری هستند. موتیف LEETPTW موجود در دُمین TM1 پروتئین‌های *Mlo* شناسایی گردید، اسیدآمینه‌های L، T، P و W این موتیف در تمامی گونه‌ها بسیار محافظت شده بودند. به طور مشابه، پنستروگا (Panstruga 2005a) یک موتیف چهار اسید آمینه D/E-F-S/T-F موجود در ناحیه C-ترمینال پروتئین‌های *Mlo* که در مقاومت برابر سفیدک

برنج و جو نیز این وضعیت گزارش شده است (Devoto *et al.* 1999). در ساختار ژنی اعضای خانواده ژن *Mlo* یک اگزون بزرگ منفرد کدکننده دم C- ترمینال سیتوپلاسمی قابل مشاهده است. اندازه اینترون‌ها در ژن‌های *Mdmlo* نسبت به ژن‌های *Tamlo* بزرگتر بود. به نظر می‌رسد که سازمان‌دهی اگزون-اینترون در بین اُرتولوگ‌ها نسبت به میان پارالوگ‌ها مشابه‌تر است (شکل ۳). و همچنین به نظر می‌رسد که پارالوگ‌های پروتئینی *Mdmlo* و پارالوگ‌های پروتئینی *Tamlo* از نظر وزن مولکولی، طول اسید آمینه و خصوصیات فیزیکوشیمیایی نسبت به جفت‌های اُرتولوگ خود دارای تنوع بیشتری باشند.

تجزیه و تحلیل عناصر تنظیمی فعال *cis* نواحی پروموتور اعضای پروتئینی *Mdmlo* و *Tamlo* تنوع عملکردهای این پروتئین‌ها را نشان داد. گزارش شده است که پروتئین‌های *Mlo* در پاسخ به حمله بیمارگر قارچی دخیل هستند (Feechan *et al.* 2009; Kim and Hwang 2012). همچنین گمان می‌رود که در میان خانواده‌های ژنی مرتبط با رشد و فیزیولوژی، قرار بگیرند (Chen *et al.* 2009). مثلاً بیان ژن *Mlo* با تیمار ABA (اسید آبسزیک) و همچنین در پاسخ به چندین تنش زنده و غیرزنده افزایش یافته است (Kumar *et al.* 2001; Chen *et al.* 2014; Lim and Lee 2006). همچنین گزارش شده است که تمام ژن‌های *AtMlo* در سازوکارهای دفاعی سلولی نقش دارند، احتمالاً از طریق مسیرهای مرگ سلولی در پاسخ به ورود بیمارگر قارچی در میزبان (www.arabidopsis.org), که این نشانگر تکامل خانواده ژن *Mlo* در پاسخ به تهاجم بیمارگر است. در حقیقت، پاسخ ژن‌های *Mlo* به تنش‌های زنده و غیرزنده متنوع (زود هنگام، دیررس یا مداوم) است و به نوع تنش بستگی دارد.

پودری درگیر است، گزارش کرد. ناحیه C- ترمینال پروتئین‌های *Mlo* گونه‌های گیاهی را به منظور جستجوی این موتیف بررسی گردید. موتیف E-F-S-F در پروتئین‌های *Tamlo6* (AB581577) و *AtMlo6* (AT2G17480) و موتیف D-F-S-F در پروتئین‌های *Mdmlo8* (XM-029089859 و XM-029094138)، *Mdmlo11* (XM-029100222، XM-029098108 و AF384144، GQ397362) *Tamlo2*، (XM-008387930 و AF361932) *Tamlo1* (AF361933 و AF384145) شناسایی گردید (شکل ۴d) که ممکن است این دو موتیف در مقاومت برابر سفیدک پودری دخیل باشند. جهش در این ژن‌ها می‌تواند توسط تکنیک‌های مناسبی نظیر TILLING^۹ و یا CRISPR^{۱۰} ایجاد شود و واکنش جهش‌یافته‌ها در برابر بیماری سفیدک پودری برای تایید پیش‌بینی‌های فوق ارزیابی شود. از طرف دیگر می‌توان این ژن‌ها را همسان سازی کرد و برای انتقال ژن، به منظور تعیین نقش آن‌ها در بیماری سفیدک پودری، مورد استفاده قرار داد. (Acevedo-Garcia *et al.* 2014).

حفاظت ساختاری در میان اُرتولوگ‌ها

اعضای خانواده ژن *Mlo* در گونه‌های گندم تعداد مشابهی از اگزون‌ها (اغلب ۱۱ اگزون) را نشان دادند و در مورد گونه‌های سیب نیز این چنین بود (معمولاً ۱۴ اگزون) (جدول ۱و۲)، که این بیانگر این است که اعضای خانواده ژن *Mlo* در گونه‌های گندم، همچنین در گونه‌های سیب، سازمان ژنی و اتصالات اگزون به اینترون مشابه و محافظت شده‌ای دارند. چنانچه که در مورد آراییدوپسیس،

^۹ Targeting Induced Local Lesion in Genome

^{۱۰} Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

MdMlo و TaMlo از طریق همولوژی با پروتئین‌های AtMlo، تعامل آن‌ها را با چندین پروتئین دیگر درگیر در مسیر دفاعی پیش‌بینی کرد. یافته‌های این پژوهش اطلاعاتی را در مورد خانواده ژن Mlo ارائه می‌دهد که می‌تواند برای مطالعات مرتبط با تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های Mlo گندم و سیب و انتخاب کاندیدای مناسب اعضای خانواده ژنی TaMlo و MdMlo برای تحقیقات دقیق مولکولی شامل همسان سازی کردن و مشخصات عملکردی آن‌ها مفید باشد.

به عنوان مثال، زخم شدن باعث افزایش سریع بیان ژن‌های Mlo در آراییدوپسیس می‌شود، در حالی که آلودگی قارچی، بیان ژن‌های Mlo را پنج روز پس از آلودگی در آراییدوپسیس و جو القا می‌کند (Jarosch et al. 2003; Chen et al. 2006). این پاسخ‌های متنوع ژن‌های Mlo، درک سازوکار و نقش عملکردی ژن‌های Mlo را دشوار می‌کند. در حال حاضر بانک اطلاعاتی STRING، فقط عملکردها و تعاملات ژن‌های AtMlo را با ژن‌های دیگر دربر می‌گیرد. تجزیه و تحلیل STRING اعضای پروتئینی

منابع

- Acevedo-Garcia, J., Kusch, S. and Panstruga, R. 2014. Magical mystery tour: MLO proteins in plant immunity and beyond. *New Phytologist* 204: 273-281.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Atzema, J. L. 1998. Durability of mlo resistance in barley against powdery mildew caused by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. Eidgenössische Technische Hochschule Zurich.
- Bailey, T. L., Williams, N., Misleh, C. and Li, W. W. 2006. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Research* 34: W369-W373.
- Burge, C. and Karlin, S. 1997. Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *Journal of Molecular Biology* 268: 78-94.
- Büschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., Van Daelen, R., Van Der Lee, T., Diergaarde, P. and Groenendijk, J. 1997. The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88: 695-705.
- Chen, Z., Hartmann, H. A., Wu, M. J., Friedman, E. J., Chen, J. G., Pulley, M., Schulze-Lefert, P., Panstruga, R. and Jones, A. M. 2006. Expression analysis of the AtMLO gene family encoding plant-specific seven-transmembrane domain proteins. *Plant Molecular Biology* 60: 583-597.
- Chen, Z., Noir, S., Kwaaitaal, M., Hartmann, H. A., Wu, M. J., Mudgil, Y., Sukumar, P., Muday, G., Panstruga, R. and Jones, A. M. 2009. Two seven-transmembrane domain mildew resistance locus O proteins cofunction in Arabidopsis root thigmomorphogenesis. *The Plant Cell* 21: 1972-1991.
- Consonni, C., Humphry, M. E., Hartmann, H. A., Livaja, M., Durner, J., Westphal, L., Vogel, J., Lipka, V., Kemmerling, B. and Schulze-Lefert, P. 2006. Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nature Genetics* 38: 716-720.
- Deshmukh, R., Singh, V. and Singh, B. 2016. Comparative analysis of genome-wide Mlo gene family in *Cajanus cajan* and *Phaseolus vulgaris*. *Genetica* 144: 229-241.
- Devoto, A., Piffanelli, P., Nilsson, I., Wallin, E., Panstruga, R., Von Heijne, G. and Schulze-Lefert, P. 1999. Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the Mlo family in plants. *Journal of Biological Chemistry* 274: 34993-35004.
- Elliott, C., Müller, J., Miklis, M., Bhat, R. A., Schulze-Lefert, P. and Panstruga, R. 2005a. Conserved extracellular cysteine residues and cytoplasmic loop-loop interplay are required for functionality of the heptahelical MLO protein. *Biochemical Journal* 385: 243-254.
- Elliott, C., Müller, J., Miklis, M., Schulze-Lefert, P. and Panstruga, R. 2005b. Conserved extracellular cysteine

- residues and cytoplasmic loop-loop interplay are required for functionality of the heptahelical MLO protein. *Biochemical Journal* 385: 243-254.
- Feechan, A., Jermakow, A. M. and Dry, I. B. 2009. Grapevine MLO candidates required for powdery mildew pathogenicity? *Plant Signaling and Behavior* 4: 522-523.
- Filiz, E. and Vatansever, R. 2018. Genome-wide identification of mildew resistance locus O (MLO) genes in tree model poplar (*Populus trichocarpa*): powdery mildew management in woody plants. *European Journal of Plant Pathology* 152: 95-109.
- Franceschini, A., Szklarczyk, D., Frankild, S., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., Lin, J., Minguez, P., Bork, P. and Von Mering, C. 2012. STRING v9. 1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Research* 41: D808-D815.
- Fu, X. L., Lu, Y. G., Liu, X. D. and Li, J. Q. 2009. Crossability barriers in the interspecific hybridization between *Oryza sativa* and *O. meyeriana*. *Journal of Integrative Plant Biology* 51: 21-28.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D. and Bairoch, A. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. Pp. 571-607, *In* (ed.)^(eds.). The proteomics protocols handbook, Springer.
- Guo, A., Zhu, Q., Chen, X. and Luo, J. 2007. GSDS: a gene structure display server. *Yi chuan= Hereditas* 29: 1023-1026.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 9/NT. *Nucleic acids symposium series*. pp. 95-98. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
- Humphry, M., Reinstaedler, A., Ivanov, S., Bisseling, T. and Panstruga, R. 2011. Durable broad-spectrum powdery mildew resistance in pea *erl* plants is conferred by natural loss-of-function mutations in PsMLO1. *Molecular Plant Pathology* 12: 866-878.
- Jarosch, B., Jansen, M. and Schaffrath, U. 2003. Acquired resistance functions in *mlo* barley, which is hypersusceptible to *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 107-114.
- Jørgensen, I. H. 1992. Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* 63: 141-152.
- Jung, E. H., Jung, H. W., Lee, S. C., Han, S. W., Heu, S. and Hwang, B. K. 2004. Identification of a novel pathogen-induced gene encoding a leucine-rich repeat protein expressed in phloem cells of *Capsicum annuum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1676: 211-222.
- Kędzierski, Ł., Montgomery, J., Curtis, J. and Handman, E. 2004. Leucine-rich repeats in host-pathogen interactions. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 52: 104-112.
- Kemmerling, B., Schwedt, A., Rodriguez, P., Mazzotta, S., Frank, M., Quamar, S., Mengiste, T., Betsuyaku, S. and Parker, J. 2007. Mü ssig C, Thomma BPHJ, Albrecht C, de Vries S, Hirt H, Nü mberger T: The BR11-associated kinase1, BAK1, has a brassinolideindependent role in plant cell-death control. *Current Biology* 17: 1116-1122.
- Kim, D. S. and Hwang, B. K. 2012. The pepper MLO gene, CaMLO2, is involved in the susceptibility cell-death response and bacterial and oomycete proliferation. *The Plant Journal* 72: 843-855.
- Kim, M. C., Lee, S. H., Kim, J. K., Chun, H. J., Choi, M. S., Chung, W. S., Moon, B. C., Kang, C. H., Park, C. Y. and Yoo, J. H. 2002a. MLO, a modulator of plant defense and cell death, is a novel calmodulin-binding protein isolation and characterization of a rice *Mlo* homologue. *Journal of Biological Chemistry* 277: 19304-19314.
- Kim, M. C., Panstruga, R., Elliott, C., Müller, J., Devoto, A., Yoon, H. W., Park, H. C., Cho, M. J. and Schulze-Lefert, P. 2002b. Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature* 416: 447.
- Konishi, S., Sasakuma, T. and Sasanuma, T. 2010. Identification of novel *Mlo* family members in wheat and their genetic characterization. *Genes and Genetic Systems* 85: 167-175.
- Kumar, J., Hückelhoven, R., Beckhove, U., Nagarajan, S. and Kogel, K. H. 2001. A compromised *Mlo* pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. *Phytopathology* 91: 127-133.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157: 105-132.

- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van De Peer, Y., Rouzé, P. and Rombauts, S. 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research* 30: 3. ۳۲۷-۳۲۵
- Lim, C. W. and Lee, S. C. 2014. Functional roles of the pepper MLO protein gene, CaMLO2, in abscisic acid signaling and drought sensitivity. *Plant Molecular Biology* 85: 1-10.
- Liu, J. H., Peng, T. and Dai, W. 2014. Critical cis-acting elements and interacting transcription factors: key players associated with abiotic stress responses in plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 32: 303-317.
- Liu, Q. and Zhu, H. 2008. Molecular evolution of the MLO gene family in *Oryza sativa* and their functional divergence. *Gene* 409: 1-10.
- Nekrasov, V., Wang, C., Win, J., Lanz, C., Weigel, D. and Kamoun, S. 2017. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Scientific Reports* 7: 1-6.
- Osakabe, Y., Maruyama, K., Seki, M., Satou, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2005. Leucine-rich repeat receptor-like kinase1 is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17: 1105-1119.
- Panda, S. and Chandra, G. 2012. Physicochemical characterization and functional analysis of some snake venom toxin proteins and related non-toxin proteins of other chordates. *Bioinformation* 8: 891.
- Panstruga, R. 2005a. Discovery of novel conserved peptide domains by ortholog comparison within plant multi-protein families. *Plant Molecular Biology* 59: 485-500.
- Panstruga, R. 2005b. Serpentine plant MLO proteins as entry portals for powdery mildew fungi. Portland Press Limited.
- Parlevliet, J. 1993. What is durable resistance, a general outline. Pp. 23. *In* (ed.) (eds.). *Durability of disease resistance*, Springer.
- Pavan, S., Jacobsen, E., Visser, R. G. and Bai, Y. 2010. Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Molecular Breeding* 25: 1.
- Pessina, S., Pavan, S., Catalano, D., Gallotta, A., Visser, R. G., Bai, Y., Malnoy, M. and Schouten, H. J. 2014. Characterization of the MLO gene family in Rosaceae and gene expression analysis in *Malus domestica*. *Biomedicine Central Genomics* 15: 618.
- Piffanelli, P., Zhou, F., Casais, C., Orme, J., Jarosch, B., Schaffrath, U., Collins, N. C., Panstruga, R. and Schulze-Lefert, P. 2002. The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Physiology* 129: 1076-1085.
- Punta, M., Coghill, P., Eberhardt, R., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., Pang, N., Forslund, K. and Ceric, G. other authors. (2012;). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 40: D1.
- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R. and Lopez, R. 2005. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Research* 33: W116-W120.
- Reddy, V. S., Ali, G. S. and Reddy, A. 2003. Characterization of a pathogen-induced calmodulin-binding protein: mapping of four Ca²⁺-dependent calmodulin-binding domains. *Plant Molecular Biology* 52: 143-159.
- Severoglu, Z. and Ozyigit, I. I. 2012. Powdery mildew disease in some natural and exotic plants of Istanbul, Turkey. *Pakistan Journal of Botany* 44: 387-393.
- Shen, Q., Zhao, J., Du, C., Xiang, Y., Cao, J. and Qin, X. 2012. Genome-scale identification of MLO domain-containing genes in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Genes and Genetic Systems* 87: 89-98.
- Singh, V., Singh, A., Chand, R. and Singh, B. 2012. Genome wide analysis of disease resistance mlo gene family in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Journal Plant Genom* 2: 18-27.
- Swarbreck, D., Wilks, C., Lamesch, P., Berardini, T. Z., Garcia-Hernandez, M., Foerster, H., Li, D., Meyer, T., Muller, R. and Ploetz, L. 2007. The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Research* 36: D1009-D1014.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Torii, K. U. 2004. Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *International Review of Cytology* 234: 1-46.
- Tusnady, G. E. and Simon, I. 2001. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*

17: 849-850.

- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., Fontana, P., Bhatnagar, S. K., Troggio, M. and Pruss, D. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus× domestica* Borkh.). *Nature Genetics* 42: 833-839.
- Yu, C. S., Chen, Y. C., Lu, C. H. and Hwang, J. K. 2006. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 64: 643-651.
- Zaidi, S. S. E. A., Mukhtar, M. S. and Mansoor, S. 2018. Genome editing: targeting susceptibility genes for plant disease resistance. *Trends in Biotechnology* 36: 898-906.