

ارزیابی توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی آنزیم‌های سیتوکرم P450 در قارچ بیمارگر حشرات *Beauveria bassiana*

مریم راشکی^{۱*}، مجتبی مرتضوی^۲

۱. استادیار گروه تنوع زیستی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری

پیشرفته، کرمان

۲. استادیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری

پیشرفته، کرمان

چکیده

توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی و روابط فیلوژنتیکی بین ژن‌های کد کننده هفت آنزیم سیتوکرم P450 متعلق به قارچ بیمارگر حشرات *Beauveria bassiana* جدایه ATCC90517 موجود در بانک ژن مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نتایج BLASTN، بیشترین میزان شباهت هفت توالی مورد بررسی با ژن‌های *B. bassiana* جدایه ARSEF (۸۴-۱۰۰ درصد) و سپس قارچ‌های *Cordyceps militaris* و *Isaria fumosorosea* (۷۶-۸۹ درصد) مشاهده شد که مطابق نتایج BLASTP بود. محاسبه میزان درصد شباهت توالی‌ها با یکدیگر با استفاده از برنامه SIAS نشان داد که تنها توالی اسید آمینه پروتئین‌های مربوط به دو ژن *CYP52X1* و *CYP52G11* بالای ۴۷ درصد شباهت نشان دادند که در یک خانواده (*CYP52*) قرار گرفتند توالی‌های مرتبط با خانواده‌های مختلف شباهت کمتر از ۴۴ درصد داشتند. درخت‌های فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از نرم‌افزار IQ-tree v.1.6 بر مبنای نوکلئوتید و اسید آمینه نشان دادند که *CYP53A26* و *CYP617N1* با بیشترین میزان شباهت به یکدیگر در یک گروه جداگانه قرار گرفتند. سایر ژن‌های P450 نیز با هم در یک گروه بودند. تعیین ویژگی‌های پروتئینی و نواحی حفاظت شده در هفت آنزیم سیتوکرم P450 در قارچ *B. bassiana* به دلیل نقش آن‌ها در اتصال به آهن بسیار مهم و ضروری است. حضور اسید آمینه‌های متنوع با خصوصیات مختلف در نواحی حفاظت شده توانسته دامنه میزبانی این قارچ را در کنترل حشرات آفت افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: روابط فیلوژنتیکی، ژن، سیتوکرم P450، ناحیه حفاظت شده

* نویسنده رابط، پست الکترونیکی: ma_rashkigh@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۸/۸ - تاریخ پذیرش مقاله: ۹۸/۳/۱۳



مقدمه

به دلیل توسعه سریع مقاومت حشرات به حشره‌کش‌های شیمیایی، تاکنون کاربرد آفت‌کش‌های شیمیایی با موفقیت همراه نبوده است. کنترل بیولوژیک با استفاده از موجودات زنده مانند بیمارگرهای حشرات یا دشمنان طبیعی علیه سایر حشرات آفت و ایجاد یک همه‌گیری است که به سرعت منتشر شده و آفات زیان‌آور را هدف قرار می‌دهد. قارچ‌های بیمارگر که حشرات را انگلی می‌کنند سازگار با استراتژی‌های IPM (Inglis et al., 2001) و سلاح‌های با ارزشی هستند که نقش مهمی در پیشبرد مدیریت تلفیقی آفات بازی می‌کنند.

تا کنون جدایه‌های مختلفی از قارچ‌های بیمارگر حشرات برای کنترل حشرات آفت استفاده شده است که می‌توان به *Beauveria bassiana*، *Metarhizium anisopliae* و *Nomuraea rileyi* اشاره نمود (Vu et al., 2007). یکی از قارچ‌های بیمارگر مهم (*Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota, Hypocreales) است که در این قارچ اسپورها به کوتیکول می‌چسبند و در شرایط بهینه جوانه می‌زنند و با تجزیه جلد حشرات وارد هموسل شده و در بافت‌ها تکثیر می‌شود. حشره میزبان در اثر از دست دادن مواد غذایی بدن، تخریب بافت‌ها و مسمومیت با سموم ترشح شده توسط قارچ از بین می‌رود (Inglis et al., 2001). قارچ بیمارگر *B. bassiana* با دامنه میزبانی وسیع بیش از ۲۰۰ گونه از ۹ راسته حشرات را آلوده می‌کند (Feng et al., 1994).

سیتوکروم‌های P450 یک بالا خانواده بزرگ و متنوع از مونواکسی‌ژنازهای دارای آهن و محصول خانواده بزرگ ژن‌های CYP و در زمره مهم‌ترین آنزیم‌ها برای متابولیسم مولکول‌های داخلی و سنتز شده می‌باشند؛ از جمله می‌توان به آلکان‌ها، ترکیب اصلی هیدروکربنی کوتیکول بسیاری از حشرات، اشاره کرد که بستری برای فعالیت این آنزیم‌ها می‌باشند (Ortiz de Montellano, 2005). به نظر می‌رسد که وجود این سیتوکروم‌ها، در گونه‌های یوکاریوتیک و نه باکتری‌ها غیر قابل اجتناب است، زیرا بعضی از باکتری‌ها فاقد آنزیم‌های CYP می‌باشند. یوکاریوت‌ها برای بیوسنتز استرول‌ها که از اجزاء تشکیل دهنده غشاء پلاسمایی هستند، به آنزیم‌های CYP نیاز دارند (Vrzal et al., 2008). سیتوکروم‌های P450 نقش مهمی در متابولیسم ترکیبات مختلف و تغییر کاتالیز دامنه وسیعی از ترکیبات چربی‌دوست بازی می‌کنند.

مطالعات بیان ژن با استفاده از دامنه‌ای از آلکان‌ها همانند عصاره مشتق از کوتیکول رویی سن خونخوار *Triatomas infestans* Klug (Hem.: Reduviidae) نشان داد که الگوی بیان افتراقی برای ژن‌های P450 مورد آزمایش وجود داشته است و قارچ بیمارگر *B. bassiana* حاوی یک سری از آنزیم‌ها با تخصص هم‌پوشان برای هدف‌گیری لیپیدهای حشرات میزبان می‌باشد. تجزیه و تحلیل چند ژنی در ترجمه توالی‌ها نشان داد این آنزیم بالاترین سطح القاء را روی آلکان‌ها و عصاره کوتیکول رویی حشره دارا می‌باشد و عضوی از یک خانواده جدید از سیتوکروم P450، با سه توالی تعیین شده به‌عنوان اولین عضوهای زیرخانواده‌های جدید P450 است (Pedrini et al., 2010). آنزیم‌های سیتوکروم P450 تسریع کننده، تسهیل کننده و کاتالیز کننده انواع واکنش‌ها مثل اکسیداسیون و احیا، دی‌آسیلاسیون، O-دی‌آلکالاسیون، S-اکسیداسیون و هیدروکسیلاسیون هستند (Nelson, 2004). حداقل ۵۷ نوع ژن مختلف سیتوکروم و ۳۳ ژن کاذب در ۱۸ خانواده وجود دارد که تنوع خانواده‌ها مربوط به فرم‌های مختلف این آنزیم است (Nelson, 2004).

در این تحقیق، توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی آنزیم‌های سیتوکروم P450 در قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* ارزیابی شد و روابط فیلوژنتیکی بین ژن‌ها و پروتئین‌های فوق‌الذکر با نرم‌افزارهای نوین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بررسی میزان شباهت ژن‌های مختلف کد کننده آنزیم‌های سیتوکرم P450 در قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای مربوط به هفت ژن کد کننده آنزیم سیتوکروم P450 در قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* جدایه ATCC 90517 توالی یابی شده توسط پدرینی و همکاران (Pedrini et al., 2010) از پایگاه NCBI جمع‌آوری شد (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (جدول ۱). توالی‌یابی پروتئین‌ها به صورت ترجمه موضوعی (Conceptual translation) توسط نویسنده صورت گرفته است.

حفاظت شده‌ترین توالی ژنی P450 در قارچ‌ها با نام CYP51F1 مربوط به مخمر *Saccharomyces cerevisiae* (با کد U10555) به‌عنوان مرجع مورد استفاده قرار گرفت. برای شناسایی توالی‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی آنزیم‌های سیتوکرم P450 در قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* از برنامه‌های BLASTN و BLASTP استفاده شد. توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای ژن‌های مورد بررسی با برنامه MAFFT v7 روش L-INS هم‌ردیف‌سازی شدند (Kato et al., 2017). توالی‌های هم‌ردیف‌سازی شده با برنامه Mesquite.v.3.04 (Maddison and Maddison, 2015) به‌صورت دستی تصحیح و مورد بازبینی قرار گرفتند و با برنامه BOXSHADE.v.3.21 نمایش داده شدند. میزان درصد شباهت توالی‌ها با یکدیگر با استفاده از برنامه SIAS محاسبه شد.

بررسی روابط فیلوژنتیکی بین ژنی و پروتئینی آنزیم‌های سیتوکرم P450 در قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* در این مرحله به منظور بررسی روابط فیلوژنتیکی توالی‌های مورد بررسی با یکدیگر از نرم افزار IQ-tree v.1.6 (Nguyen et al., 2015) و روش حداکثر احتمال درست‌نمایی (Maximum Likelihood) استفاده شد. برای ارزیابی میزان اعتماد به درخت فیلوژنی از بوت استرپ با تکرار ۱۰۰۰ و برای مشاهده و رسم درخت از برنامه Figtree v.1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>) استفاده شد. برای بررسی بیشتر روابط فیلوژنتیکی علاوه بر رسم درخت، شبکه به روش Neighbor-Joining با برنامه SplitTree v4.11.3 (Huson and Bryant, 2006) رسم شد.

نتایج و بحث

بررسی میزان شباهت ژن‌های مختلف کد کننده آنزیم‌های سیتوکرم P450 در قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* سیتوکروم P450 مجموعه‌ای از پروتئین‌های مونواسی‌ژناز و دارنده آهن می‌باشد. این آنزیم‌ها نه تنها در فعالیت‌های متابولیکی مختلف شرکت می‌کنند بلکه با تغییرات شیمیایی باعث سازگاری موجود با محیط زیست خود می‌شوند (Guengerich, 2008). در این تحقیق توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای هفت ژن مربوط به آنزیم سیتوکروم P450 در قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* مورد بررسی قرار گرفتند که بیشتر توسط پدرینی و همکاران تعیین توالی شده بودند (Pedrini et al., 2010). براساس نتایج حاصل از BLASTN، هفت توالی نوکلئوتیدی مورد بررسی بیشترین میزان شباهت را با ژن‌های هم‌خانواده در قارچ *B. bassiana* strain ARSEF (۸۴-۱۰۰ درصد) و سپس ژن‌های P450 قارچ‌های *Cordyceps militaris* و *Isaria fumosorosea* (۷۶-۸۹ درصد) داشتند (Zhao et al., 2012). بالاترین میزان شباهت توالی پروتئینی بر اساس نتایج حاصل از برنامه BLASTP نیز مانند BLASTN مربوط به قارچ *B. bassiana* strain ARSEF و به میزان ۹۳-۱۰۰ درصد مشاهده شد. میزان شباهت توالی‌های پروتئینی مورد بررسی با قارچ‌های *C. militaris* و *I. fumosorosea* به میزان ۶۰-۹۱ درصد بود. گونه *B. bassiana* متعلق به خانواده Clavicipitaceae است. درحالی‌که، دو

گونه *C. militaris* و *I. fumosorosea* در خانواده Cordycipitaceae قرار گرفته‌اند (Humber et al., 2012). با این حال، وجود روابط نزدیک فیلوژنتیکی این قارچ‌ها در مطالعات گذشته نیز ثابت شده است (Rehner & Buckley, 2005). توالی‌های نوکلئوتیدی و اسیدآمینه ژن‌های مورد بررسی هم‌ردیف‌سازی و میزان شباهت آن‌ها با یکدیگر با استفاده از برنامه SIAS محاسبه شد (شکل ۲). نامگذاری ژن‌ها بر اساس توالی پروتئینی و میزان شباهت و مطالعات فیلوژنتیکی انجام می‌شود. توالی‌های پروتئینی با شباهت بالای حدود ۴۴ درصد در یک خانواده قرار می‌گیرند (Nelson, 2006). همان‌گونه که در تحقیق حاضر مشاهده شد تنها توالی اسید آمینه CYP52X1 و CYP52G11 که در یک خانواده (خانواده ۵۲) قرار داشتند بالای ۴۴ درصد شباهت نشان دادند. توالی‌های مرتبط با خانواده‌های مختلف شباهت کمتر از ۴۴ درصد دارند. در برخی موارد میزان درصد شباهت بین توالی اسید آمینه‌ای کمتر از ۲۰ درصد می‌باشد. نتایج حاصل از هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی اسید آمینه هفت آنزیم سیتوکروم P450 در قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* در شکل ۱ نشان داده شده است.

بهم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی اسید آمینه هفت آنزیم سیتوکروم P450 در قارچ بیمارگر، دو ناحیه حفاظت شده شامل EXXR و FXXGXRXCXGCXG در بین توالی‌ها مشاهده شد (شکل ۱) و نشان داد که اسید گلوتامیک و آرژینین در ناحیه EXXR به صورت حفظ شده دیده می‌شوند. همچنین، ترتونین و لوسین به‌عنوان دو اسیدآمینه غالب در موقعیت‌های دوم و سوم نواحی حفاظت شده قرار دارند. این نواحی حفاظت شده در ایجاد خمش و تشکیل ساختار سه بعدی از اهمیت زیادی برخوردار هستند. هر گونه جهش در توالی‌های حفاظت شده گلوتامیک و آرژینین باعث ایجاد اشکال غیر فعال خواهد شد (Rupasinghe et al., 2006; Li et al., 2013; Syed & Mashele, 2014).

تحقیق حاضر نشان داد که ناحیه حفاظت شده CXG دارای یک سیستئین کاملاً حفظ شده است؛ در حالی که، گلیسین و فنیل آلانین‌های موجود می‌توانند متغیر باشند. سیستئین در ناحیه برآمدگی بتا قرار دارد و به‌عنوان پنجمین لیگاند متصل به یون آهن فعالیت می‌کند. گلیسین قرار گرفته در فاصله چهار اسیدآمینه قبل از سیستئین به تشکیل یک پیچش سنجاق سری کمک می‌کند و گلیسین قرار گرفته در فاصله دو اسید آمینه بعد از سیستئین باعث تشکیل یک پیچ تند در ساختار سه بعدی پروتئین می‌شود. مطابق نتایج سید و ماشل (Syed and Mashele, 2014) در توالی‌های مورد بررسی، ناحیه حفاظت شده CXG در قارچ بیمارگر *B. bassiana* همانند سایر قارچ‌ها بسیار متغیر است و گلیسین، اسیدآمینه غالب در موقعیت سوم ناحیه حفاظت شده است. همچنین، در موقعیت دوم، اسپاراژین اسیدآمینه غالب است. اما، سید و ماشل (Syed and Mashele, 2014) نشان دادند که اسیدآمینه پرولین به‌طور عمده در موقعیت دوم قرار دارد.

بررسی روابط فیلوژنتیکی بین ژنی و پروتئینی آنزیم‌های سیتوکروم P450 در قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* در بررسی درخت فیلوژنی با نرم افزار IQ-tree v.1.6 مدل‌های GTR+I+G4 و LG+F+R4 به‌عنوان بهترین مدل‌های جایگزین برای رسم درخت فیلوژنی به‌ترتیب بر اساس توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی تعیین شدند. همان‌گونه که مشاهده شد ژن‌های P450 مربوط به قارچ *B. bassiana* جدایه ATCC90517 از CYP51F1 (متعلق به مخمر به‌عنوان مرجع) مشتق شده‌اند (شکل ۲). در درخت‌های فیلوژنتیکی رسم شده بر مبنای نوکلئوتید و اسیدآمینه، CYP52X1 و CYP52G11 متعلق به خانواده CYP52 در کنار یکدیگر قرار گرفتند. نتایج به‌دست آمده برای رسم درخت فیلوژنتیکی با نتایج پدرینی و همکاران (Pedrini et al., 2010) مطابقت داشت. اما، بوت استرپ درخت فیلوژنتیکی در این پژوهش به‌دلیل استفاده از برنامه IQ-tree (به جای PhyML) بالاتر از بوت استرپ محاسبه شده توسط پدرینی و همکاران (Pedrini et al., 2010)

بود. برنامه IQ-tree یک برنامه مبنی بر روش حدکثر احتمال درست‌نمایی (likelihood Maximum) است که سرعت و کارایی بالاتری نسبت به سایر نرم افزارهای مشابه (PhyML و RaXML) دارد (Nguyen et al., 2015). همان‌گونه که در شکل ۲ مشاهده شد، نحوه گروه‌بندی توالی‌ها در درخت رسم شده بر اساس توالی اسید آمینه و نوکلئوتیدی با یکدیگر مطابقت دارد و بوت‌استرپ درخت رسم شده بر مبنای توالی نوکلئوتیدی بیشتر از درخت رسم شده بر مبنای توالی پروتئینی است.

تجزیه و تحلیل روابط فیلوژنتیکی در برنامه SplitTree v4.11.3 با رسم شبکه نشان‌دهنده حضور سیگنال‌های متناقض یا تاریخچه فیلوژنتیکی جایگزین بود (شکل ۳) که برای اولین بار در پژوهش حاضر انجام شده است. وجود نوترکیبی، هیبریداسیون و انتقال ژن و وقایع این‌چنین با استفاده از یک ساختار درختی قابل مدلسازی نیست و ساختار شبکه، بیشتر به واقعیت نزدیک است (Fitch, 1997). نتایج حاصل تایید کننده نتایج درخت فیلوژنتیکی بود.

تعداد ژن P450 شناخته شده در گیاهان بسیار بیشتر از سایر موجودات است. علیرغم تعداد محدود ژن P450 در ژنوم قارچ‌ها، بیشترین میزان تنوع در ژن‌های این موجودات ثبت شده است. تاکنون ۳۹۹ خانواده در بین ۲۷۸۴ ژن مورد بررسی گزارش شده است. درحالی‌که، در گیاهان از بین ۴۲۶۲ ژن تنها ۱۲۹ خانواده گزارش شده است (Nelson, 2011; Syed & Mashele, 2014).

تعیین ویژگی‌های پروتئینی و نواحی حفاظت شده در هفت آنزیم سیتوکرم P450 در قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* به دلیل نقش آن‌ها در اتصال به آهن بسیار مهم و ضروری است. حضور اسید آمینه‌های متنوع با خصوصیات مختلف در نواحی حفاظت شده توانسته دامنه میزبانی این قارچ را در کنترل حشرات آفت افزایش دهد. اهمیت ارزیابی توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی آنزیم‌های سیتوکرم P450 در قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* و بررسی روابط فیلوژنتیکی بین ژنی و پروتئینی آن‌ها در این است که با مهندسی این هفت آنزیم سیتوکروم P450 در قارچ بیمارگر، امکان افزایش میزان واکنش کاتالیز و افزایش قدرت بیمارگری قارچ بیمارگر حشرات وجود خواهد داشت. همچنین، این نتایج، منبع مهم اطلاعاتی برای درک بهتر عملکرد آنزیم‌ها، برهمکنش آن‌ها با اجزای دیگر و فهم اثرات فنوتیپیکی جهش‌ها خواهد بود. از سوی دیگر، اهمیت آنزیم‌های CYP در توسعه عوامل درمانی جدید شناخته شده است. همچنین، آنزیم‌های تجزیه‌کننده کیتین در تجزیه پسماندهای کیتینی و در نتیجه تولید الیگوساکاریدها و کاربرد در صنعت و کنترل بیولوژیک آفات در کشاورزی نقش دارند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان و به شماره طرح ۹۶/۹۱۸/ص/۷ انجام شد.

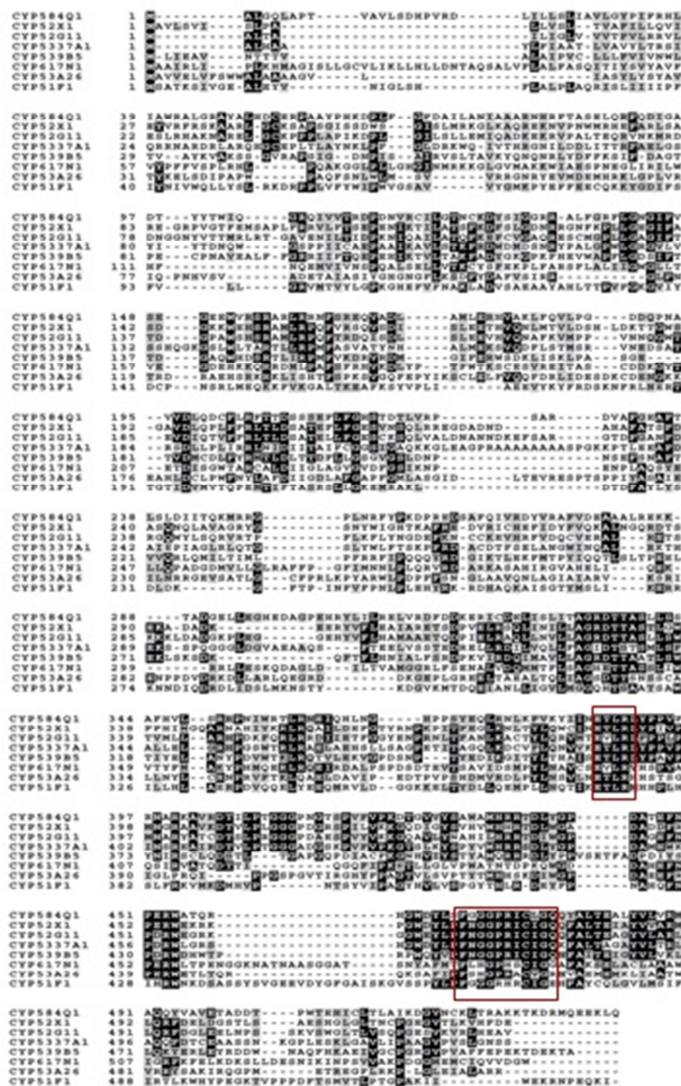
References

- Feng, M. G., Poprawski, T. J., and Khachatourians, G. G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*, 4: 3-34.
- Fitch, W. 1997. Networks and viral evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 44: S65-S75.
- Guengerich, F. P. 2008. Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 21(1): 70-83.

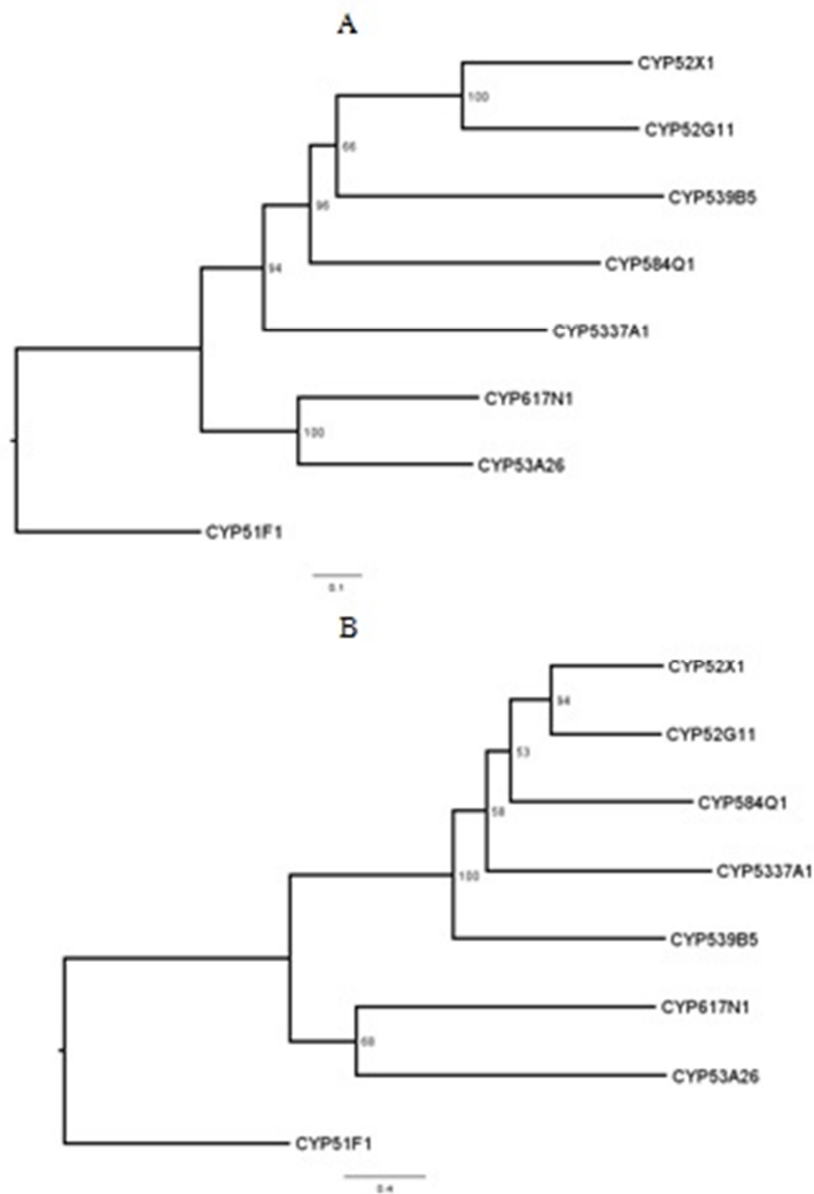
- Humber, R. A., Rocha, L. F., Inglis, P. W., Kipnis, A. and Luz, C. 2013.** Morphology and molecular taxonomy of *Evlachovaea*-like fungi, and the status of this unusual conidial genus. *Fungal Biology*, 117(1): 1-12.
- Huson, D. H. and Bryant, D. 2006.** Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2): 254-267.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M. and Strasser, H. 2001.** Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests, pp.23-69. In: Butt, T. M., Jackson, C. and Magan, N. (eds.), *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CABI Publishing, Wallingford.
- Katoh, K., Rozewicki, J. and Yamada, K. D. 2017.** MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* bbx108.
- Maddison, W. P. and Maddison, D. R. 2015.** Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.04.
- Nelson, D. R., Schuler, M. A., Paquette, S. M., Werck-Reichhart, D. and Bak, S. 2004.** Comparative Genomics of Rice and Arabidopsis. Analysis of 727 Cytochrome P450 Genes and Pseudogenes from a Monocot and a Dicot. *Plant Physiology*, 135(2): 756-772.
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A. and Minh, B. Q. 2015.** IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology Evolution*, 32: 268-274.
- Ortiz de Montellano, P. R. 2005.** *Cytochrome P450: Structure, mechanism and biochemistry*. Kluwer Academic/ Plenum, New York.
- Pedrini, N., Zhang, Sh., Juarez, M. P. and Keyhani, N. O. 2010.** Molecular characterization and expression analysis of a suite of cytochrome P450 enzymes implicated in insect hydrocarbon degradation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology*, 156: 2549-2557.
- Rehner, S. A. and Buckley, E. 2005.** A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* Teleomorphs. *Mycologia*, 97: 84-98.
- Rupasinghe, S., Schuler, M.A., Kagawa, N., Yuan, H. and Lei, L. 2006.** The cytochrome P450 gene family CYP157 does not contain EXXR in the K-helix reducing the absolute conserved P450 residues to a single cysteine. *FEBS Letters*, 580: 6338-6342.
- Syed, K. and Mashele, S. S. 2014.** Comparative analysis of P450 signature motifs EXXR and CXG in the Large and diverse kingdom of fungi: identification of evolutionarily conserved amino acid patterns characteristic of P450 family. *PLoS ONE*, 9(4): e95616.
- Vrzal, R., Daujat-Chavanieu, M., Pascussi, J. M., Ulrichova, J., Maurel, P. and Dvorak, Z. 2008.** Microtubules-interfering agents restrict aryl hydrocarbon receptor-mediated CYP1A2 induction in primary cultures of human hepatocytes via c-jun-N-terminal kinase and glucocorticoid receptor. *European Journal of Pharmacology*, 581(3): 244-254.
- Vu, V. H., Hong, S. I. and Kim, K. 2007.** Selection of entomopathogenic fungi for aphid control. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(6): 498-505.
- Zhao, B., Moody, S. C., Hider, R. C., Lei, L., Kelly, S. L., Waterman, M. R. and Lamb, D. C. 2012.** Structural analysis of cytochrome P450 105N1 involved in the biosynthesis of the zincophore, coelibactin. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 8500-8513.

جدول ۱- مشخصات ژن‌های هفت آنزیم سیتوکروم P450 در قارچ *B. bassiana*
 Table 1. Gene characteristics of seven cytochrom P450 enzymes of the fungus *B. bassiana*

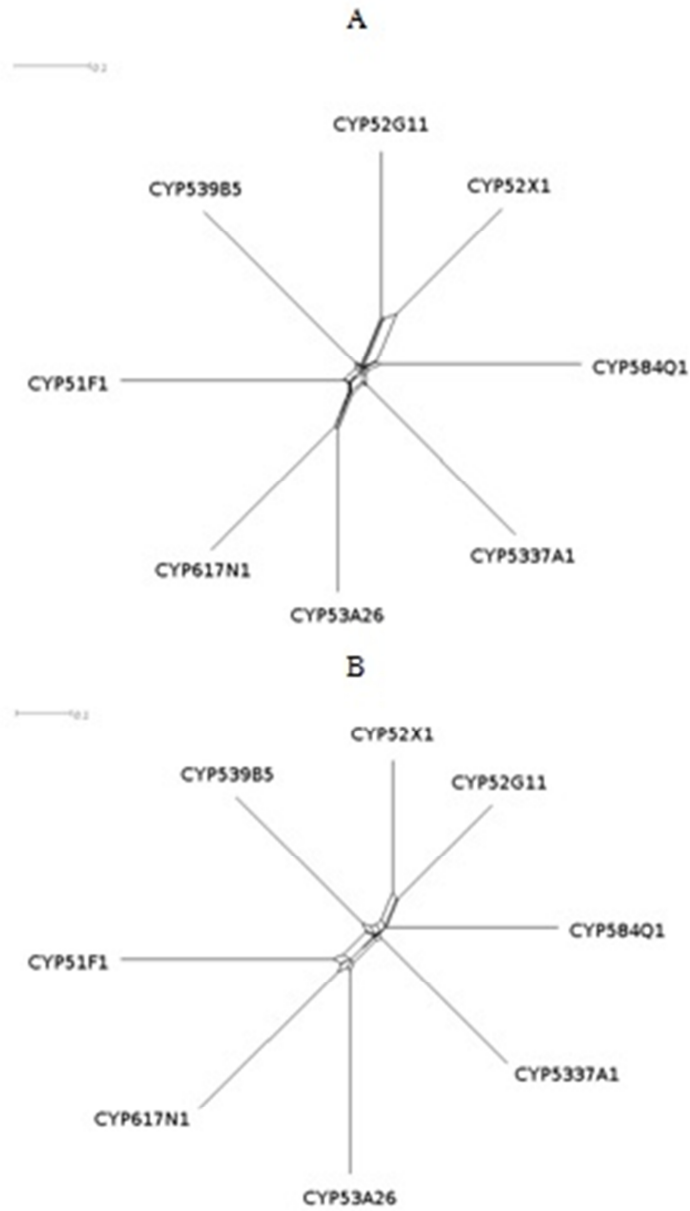
کد	ژن	اندازه نوکلئوتید (جفت باز)	کد پروتئین	اندازه پروتئین (جفت باز)
GU566080	CYP584Q1	۳۸۸۲	ADK36666	۵۳۹
GU566077	CYP539B5	۳۸۸۱	ADK36663	۵۱۵
GU566074	CYP52X1	۳۸۲۳	ADK36660	۵۲۸
GU566075	CYP5337A1	۴۹۳۰	ADK36661	۵۳۴
GU566076	CYP52G11	۵۶۴۰	ADK36662	۵۲۸
GU566078	CYP617N1	۵۴۵۹	ADK36664	۵۴۹
GU566079	CYP53A26	۲۲۲۵	ADK36665	۵۱۳



شکل ۱- هم‌ردیف سازی چندگانه توالی اسید آمینه‌های هفت آنزیم سیتوکروم P450 در قارچ *B. bassiana*
 Fig. 1. Amino acid multiple sequence alignments of seven cytochrome P450 enzymes for the fungus *B. bassiana*



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی نوکلئوتیدی (A) و اسید آمینه‌ای (B) در هفت آنزیم سیتوکروم P450 در قارچ *B. bassiana*
Fig. 2. Phylogenetic trees based on nucleotide (A) and amino acid sequence (B) in seven cytochrome P450 enzymes in the fungus *B. bassiana*



شکل ۳- NJ-Network بر اساس توالی نوکلئوتیدی (A) و اسید آمینه‌ای (B) در هفت آنزیم سیتوکروم P450 در قارچ *B. bassiana*
 Fig. 3. NJ-Network based on nucleotide (A) and amino acid sequence (B) in seven cytochrome P450 enzymes in the fungus *B. bassiana*

Evaluation of the nucleotide and protein sequences of Cytochrome P450 enzymes of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*

Rashki M^{1}, Mortezaei M²*

1- Department of Biodiversity, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

2- Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

Abstract

The nucleotide and protein sequences and phylogenetic relationships between the genes encoding seven cytochrome P450 enzymes for the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* strain ATCC90517 existed in the gene bank were assessed. Based on BLASTN results, the highest identity of the seven sequences was observed with the genes of *B. bassiana* strain ARSEF (84-100%) and then the fungi *Cordyceps militaris* and *Isaria fumosorosea* (76-89%), which was according to the BLASTP results. Calculating the percentage of sequence identity with each other using the SIAS program showed that only the amino acid sequences related to CYP52X1 and CYP52G11 genes had more than 47% identity and put in the same family (CYP52). Sequences associated with different families had identity less than 44%. The phylogenetic trees plotted using software IQ-tree v.1.6 based on the nucleotide and amino acid showed that CYP53A26 and CYP617N1 were most closely matched to each other and put in a separate group. Other P450 genes were also in the same group. Determination of the protein characteristics and motifs of seven enzymes of cytochrome P450 in the fungus *B. bassiana* is very important and necessary due to their role in iron binding. The presence of various amino acids with different properties in the motifs has been able to increase the host range of this fungus in controlling pest insects.

Keywords: Phylogenetic relationships, gene, cytochrome P450, motif

* Corresponding Author, E-mail: ma_rashkigh@yahoo.com

Received: 3 Oct. 2018 – Accepted: 3 Jun. 2018