

استفاده از تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی برای شناسایی اهداف بالقوه پروتئینی در پاتوژن

Pseudomonas syringae به منظور کنترل این پاتوژن

کامران سمیعی^{۱*}، سید محسن سهرابی^۲

۱. گروه مهندسی کشاورزی، واحد کنگاور، دانشگاه آزاد اسلامی، کنگاور، ایران

۲. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد خرم‌آباد، خرم‌آباد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: شناسایی اهداف اختصاصی در هر پاتوژن برای جلوگیری از اثرهای سوء مصرف سموم شیمیایی ضروری است. در مطالعه حاضر، با استفاده از یک روش بیوانفورماتیکی مبتنی بر همولوژی، پروتئوم پاتوژن *P. syringae* با پروتئوم گیاه گوجه‌فرنگی و دیگر محصول‌های کشاورزی میزبان آن مقایسه و تعدادی پروتئین به‌عنوان اهداف بالقوه برای مبارزه در پاتوژن انتخاب شدند.

مواد و روش‌ها: پروتئوم پاتوژن با گیاهان میزبان مقایسه و پروتئین‌های غیرمشابه انتخاب شدند. این پروتئین‌ها با پروتئوم انسان و سایر موجودات غیرهدف مقایسه و پروتئین‌های غیرمشابه انتخاب و اهداف بالقوه تحت آنالیزهای کیفی مختلفی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج آنالیزها، ۹۵ پروتئین را به‌عنوان اهداف منحصر بفرد مشخص کرد. از مجموع پروتئین‌ها، ۵۹ پروتئین در سیتوپلاسم، ۱۵ پروتئین در غشاء داخلی، ۱۷ پروتئین در فضای پری‌پلاسمیک، ۳ پروتئین در غشاء خارجی و ۱ پروتئین در خارج از سلول پاتوژن *P. syringae* تجمع پیدا می‌کردند.

نتیجه‌گیری: پروتئین‌های مشخص شده در این مطالعه، اهدافی بسیار مؤثر برای مبارزه بوده و هدف قرار دادن چنین پروتئین‌هایی می‌تواند به‌طور مؤثری باعث کنترل پاتوژن *P. syringae* شود. هم‌چنین طراحی و تولید مواد شیمیایی علیه این پروتئین‌های هدف، در کنار کنترل مؤثر این پاتوژن، می‌تواند طیف وسیعی از پاتوژن‌ها را کنترل کرده و از اثرهای مضر بر انسان، موجودات غیرهدف و محیط زیست جلوگیری کند.

واژه‌های کلیدی: بیوانفورماتیک، گوجه‌فرنگی، پاتوژن *P. syringae*، پروتئین‌های هدف

مقدمه

سواحل غربی آمریکای جنوبی است. گوجه‌فرنگی و محصول‌های تبدیلی آن یکی از مهم‌ترین تولیدات صنایع تبدیلی در جهان هستند به‌طوری‌که سالانه ۳۰ الی ۳۵ میلیون تن گوجه‌فرنگی تازه در کارخانجات فراهم می‌گردد. ایران از جنبه فرآوری گوجه‌فرنگی پس از کشورهای آمریکا، ایتالیا، چین، ترکیه در رتبه پنجم قرار دارد. بیماری‌های گیاهی یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده کشت محصول‌های کشاورزی از جمله گوجه‌فرنگی هستند و سالانه خسارت قابل توجهی را به این محصول‌ها وارد می‌کنند. از مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی گوجه‌فرنگی می‌توان به لکه باکتریایی یا خال‌زدگی *P. syringae p.v tomato*، پژمردگی باکتریایی *Clavibacter solanacearum*، شانکر باکتریایی *Xanthomonas campestris michiganensis* و لکه باکتریایی *pv. vesicatoria* اشاره کرد (۱).

گوجه‌فرنگی گیاهی از خانواده Solanaceae و از جنس *Solanum* و گونه اهلی آن *S. lycopersicum* است. گوجه‌فرنگی به‌طور ذاتی گیاهی علفی و چندساله است که در تمام نقاط جهان اغلب به‌صورت یکساله کشت می‌شود. گوجه‌فرنگی یکی از محصول‌های ارزشمند سبزی و صیفی در خاورمیانه به‌شمار می‌آید که پس از سیب‌زمینی از نظر اقتصادی در مقام دوم جهان قرار دارد. موطن اصلی گوجه‌فرنگی آمریکای مرکزی و جنوبی و به‌احتمال زیاد

نویسنده مسئول:

گروه مهندسی کشاورزی، واحد کنگاور، دانشگاه آزاد اسلامی، کنگاور، ایران.

پست الکترونیکی: kamransamiei@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۰۹

بین بردن آن است. با این روش علاوه بر کنترل مؤثر پاتوژن می توان از اثرهای سوء و زیان آور احتمالی مبارزه با پاتوژن بر روی انسان، موجودات غیرهدف و محیط زیست تا حد زیادی جلوگیری کرد (۱،۲۹). یکی از بهترین، سریع ترین و کم هزینه ترین روش های شناسایی اهداف در موجودات مختلف، روش های بیوانفورماتیکی هستند. بیوانفورماتیک شاخه ای از علم زیست شناسی است که به ذخیره، تجزیه و تحلیل و تفسیر اطلاعات آزمایشگاهی می پردازد (۱۰،۲۲). بیوانفورماتیک علم نوینی است که در آن با استفاده از کامپیوتر، نرم افزارهای کامپیوتری و بانک های اطلاعاتی سعی می گردد تا به مسائل بیولوژیکی به خصوص در زمینه های سلولی و مولکولی پاسخ داده شود (۱۸). در این علم با به کارگیری کامپیوتر سعی می گردد تا تحقیق های وسیع تری در خصوص پروتئین ها و ژن ها به عمل آید. بیوانفورماتیک توسط علمی مانند زیست شناسی محاسبه ای، ریاضی، بیومتری، تکامل مولکولی، ژنومیکس، پروتئومیکس و زیست شناسی سلولی و مولکولی توسعه یافته است. وجه مشترکی که تمام این علوم در بیوانفورماتیک استفاده از کامپیوتر و برنامه های کامپیوتری است. در این مطالعه با استفاده از ابزار BLASTp و ماتریس BLOSUM62 و همچنین پایگاه های NCBI، VFDB، KEGG، پروتئوم پاتوژن *P.syringae* با پروتئوم گیاهان میزبان، انسان و فلور میکروبی دستگاه گوارش و دیگر موجودات مانند مهره داران، بندپایان و نرم تنان مقایسه شد و در نهایت تعدادی پروتئین به عنوان اهداف منحصر به فرد برای مبارزه با پاتوژن *P.syringae* انتخاب شدند. اهداف انتخابی توسط ابزارهای DEG، CELLO، PSORT، Pfam، InterProScan و CDD مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند (۳،۲۷).

مواد و روش ها

نمای کلی مراحل آنالیز در این مطالعه در شکل ۱ نشان داده شده است. آنالیز شامل ۳ مرحله هم ردیفی و چندین مرحله آنالیز کیفی است (شکل ۱). ابتدا، چند دسته از اطلاعات از منابع مختلف شامل مقالات، کتب و پایگاه ها استخراج و جمع آوری شد. اطلاعات مربوط به پاتوژن *P.syringae* شامل اندازه ژنوم، تعداد ژن ها، تعداد پروتئین ها، فاکتورهای بیماری زایی و اطلاعات مسیرهای بیوشیمیایی پاتوژن از پایگاه های NCBI، VFDB، KEGG دریافت و دسته بندی شد. همچنین اطلاعات مربوط به میزبان های مختلف پاتوژن *P.syringae* شامل جنس های گیاهی *Solanum*، *Acer*، *Actinidia*، *Beta*، *Aesculus*، *Dysoxylum*، *Prunus*، *Pisum*، *Phaseolus*، *Malus*، *Panicum*، *Hordeum*

پاتوژن *P.syringae* یک باکتری میله ای شکل، گرم منفی و تاژک دار از خانواده *Pseudomonadaceae* است. این پاتوژن دارای پاتووارهای زیادی بوده و در طیف وسیعی از گیاهان ایجاد بیماری می کند. این پاتوژن برای اولین بار در گیاه یاس بنفش یا *Syringa vulgaris* جداسازی شده و به همین علت *P.syringae* نام گرفته است. پاتووارهای مختلف این پاتوژن به گیاهانی از خانواده های *Sapindaceae*، *Actinidiaceae*، *Rosaceae*، *Meliaceae*، *Poaceae*، *Amaranthaceae*، *Fabaceae* و *Oleaceae* حمله و ایجاد بیماری می کنند. این پاتوژن بیماری های مختلفی مانند لکه برگ، شانکر، آتشک و سوختگی را در گیاهان میزبان خود ایجاد می کند. با توجه به طیف وسیع میزبانی و شدت ایجاد بیماری، پاتوژن *P.syringae* به عنوان یکی از مهم ترین باکتری های بیماری زای گیاهی مطرح بوده و سالیانه خسارت قابل توجهی را در سراسر دنیا به محصول های مختلف کشاورزی وارد می کند (۳۱،۹،۱).

ژنوم کامل پاتوژن *P.syringae* در سال ۲۰۰۳ توالی یابی و مستندسازی شد. پاتوژن *P.syringae* دارای ژنومی به طول ۶۰۹۳۶۹۸ جفت باز و فاقد پلاسمید است. این ژنوم دارای محتوای GC حدود ۵۹ درصد بوده و ۵۲۲۰ ژن دارد. این تعداد ژن، ۵۰۸۹ پروتئین، ۱۶ RNA ریپوزومی، ۶۴ tRNA و ۳ نوع دیگر RNA را کد کرده و ۴۷ ژن کاذب دارند. ژنوم پاتوژن *P.syringae* با شماره NC-007005.1 قابل دسترسی است (Buell et al., 2003). در مطالعه ای، پروتئوم گیاه گوجه فرنگی آلوده شده با پاتوژن *P.syringae* بررسی شد و نتایج ۴۷۷ را مشخص کرد که در پاسخ به آلودگی نقش داشتند (۲۱). در پژوهش دیگری، با استفاده از دو روش محاسبه ای، پروتئوم پاتوژن *P.syringae* و پروتئوم گیاه آرابیدوپسیس با هم مقایسه و برهم کنش های بین آن ها بررسی شد. نتایج، وجود ۷۹۰ هزار برهم کنش را بین دو پروتئوم نشان داد (۲۴).

طبق یک تخمین محافظه کارانه، بیماری ها، حشرات و علف های هرز در سطح جهانی سالانه بین ۳۱ تا ۴۲ درصد محصول های کشاورزی را نابود یا از تولید آن ها جلوگیری می کنند. با توجه به این میزان خسارت مبارزه با بیماری ها به منظور حفظ امنیت غذایی و رونق اقتصادی امری اجتناب ناپذیر به نظر می رسد. از بین روش های مبارزه با بیماری های گیاهی دو روش مهندسی ژنتیک و استفاده از مواد شیمیایی غیر مضر برای انسان، موجودات غیرهدف و محیط زیست روش های مؤثرتری به نظر می رسند. هر دوی این روش ها نیازمند شناسایی و تعیین اهداف مؤثر در پاتوژن، به منظور جلوگیری از مکانیسم های آلودگی، رشد و تولیدمثل و همچنین از

Phaseolus, Malus, Panicum, Hordeum, Dysoxylum, Prunus, Pisum و Glycine، پروتئوم انسان و فلور میکروبی دستگاه گوارش، پروتئوم پاتوژن های باکتریایی گیاهی و پروتئوم مهره داران، بندپایان و نرم تنان چهار پایگاه داده اختصاصی در برنامه BLASTp پایگاه NCBI ایجاد شد. این پایگاه های داده اختصاصی بر اساس کدنویسی اختصاصی و برای محدود کردن هم ردیفی های بعدی و کاهش زمان هم ردیفی ها ایجاد شدند (۲).

و Glycine، اطلاعات مربوط به فلور میکروبی دستگاه گوارش انسان، اطلاعات سایر پاتوژن های باکتریایی گیاهی نیز از پایگاه های متنی شامل PMC، Pubmed، Google scholar دریافت و دسته بندی شد (۷،۱۳،۲۰). در مرحله بعد، پروتئوم پاتوژن P.syringae (شامل ۵۰۸۹) و پروتئوم از پایگاه NCBI دریافت شد. سپس، از پروتئوم میزبان های مختلف پاتوژن P.syringae شامل جنس های گیاهی Triticum، Beta، Aesculus، Actinidia، Acer، Solanum



شکل ۱- نمای کلی مراحل آنالیز

این مرحله از آنالیز برای جلوگیری از اثرهای ناخواسته هدف گیری پروتئوم های پاتوژن بر انسان و سایر موجودات غیرهدف انجام می شود. کد پایگاه های داده سفارشی پروتئوم میزبان های گیاهی و پروتئوم انسان، فلور میکروبی دستگاه گوارش، مهره داران، بندپایان و نرم تنان در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است. در مرحله بعد، توالی پروتئینی اهداف اولیه، از پایگاه NCBI دریافت شد. توالی های مورد نظر پس از دسته بندی، با ارزش مورد انتظار ۰/۰۰۱ علیه پروتئوم های موجود در پایگاه DEG10.0 تحت هم ردیفی قرار گرفتند. پروتئوم هایی از پروتئوم پاتوژن که در ارزش مورد انتظار ۰/۰۰۱ با پروتئوم های موجود در پایگاه DEG10.0 مشابه بودند به عنوان اهداف بالقوه نهایی در پاتوژن P.syringae انتخاب و بقیه پروتئوم ها حذف شدند. اهداف بالقوه نهایی پاتوژن P.syringae برای بررسی های کیفی بیشتر به مراحل بعدی منتقل شدند. ژن های ضروری، ژن هایی هستند که برای بقا میکروارگانیسم حیاتی بوده و بدون وجود آنها میکروارگانیسم قادر به ادامه حیات، رشد و نمو، هموستازی و تولیدمثل نخواهد بود. پایگاه DEG10.0 مجموعه ای از ژن های ضروری در میکروارگانیسم های باکتریایی مختلف است (۱۶).

پروتئوم پاتوژن P.syringae با ارزش مورد انتظار ۰/۰۰۱ علیه پایگاه داده اختصاصی میزبان های مختلف پاتوژن تحت هم ردیفی قرار گرفت. پروتئوم های مشابه با پروتئوم های موجود در پایگاه داده اختصاصی میزبان ها حذف شده و بقیه پروتئوم ها که هیچ شباهتی با پروتئوم های موجود در این پایگاه داده اختصاصی نداشتند وارد مرحله بعدی هم ردیفی شدند. پروتئوم های حاصل از مرحله قبل با ارزش مورد انتظار ۰/۰۰۱ علیه پایگاه داده اختصاصی انسان و فلور میکروبی دستگاه گوارش هم ردیف شدند و پروتئوم های مشابه با پروتئوم های موجود در پایگاه داده اختصاصی انسان و فلور میکروبی دستگاه گوارش حذف شده و بقیه پروتئوم ها که هیچ شباهتی با پروتئوم های موجود در این پایگاه داده اختصاصی نداشتند وارد مرحله بعدی هم ردیفی شدند. در مرحله آخر، پروتئوم های باقی مانده از مرحله قبل با ارزش مورد انتظار ۰/۰۰۱ علیه پایگاه داده اختصاصی مهره داران، بندپایان و نرم تنان مورد هم ردیفی قرار گرفته و پروتئوم های مشابه با پروتئوم های موجود در پایگاه داده اختصاصی مهره داران، بندپایان و نرم تنان حذف شده و بقیه پروتئوم ها که هیچ شباهتی با پروتئوم های موجود در این پایگاه داده اختصاصی نداشتند به عنوان اهداف اولیه در پاتوژن P.syringae انتخاب و وارد مراحل بعدی آنالیز شدند.

جدول ۱- کد پایگاه داده سفارشی میزبان های گیاهی

txid49274 [ORGN] OR txid4022 [ORGN] OR txid3624 [ORGN] OR txid43363 [ORGN] OR txid3554 [ORGN] OR txid4564 [ORGN] OR txid15563 3 [ORGN] OR txid4512 [ORGN] OR txid4539 [ORGN] OR txid3749 [ORGN] OR txid3883 [ORGN] OR txid3887 [ORGN] OR txid3754 [ORGN] OR txid3846 [ORGN]

طیف وسیع و جستجوی مسیره های متابولیکی تشکیل شده است. در جستجوی محل تجمع سلولی، جستجوی عملکردی، جستجوی

آنالیز کیفی اهداف بالقوه، از چهار جستجوی مختلف شامل جستجوی محل تجمع سلولی، جستجوی عملکردی، جستجوی

پاتوزن باکتریایی گیاهی مهم (مانند *Erwinia Agrobacterium*، *Ralstonia P. pseudomonas* و *Pectobacterium*) مورد هم-ردیفی قرار گرفتند. اهداف مشترک با بیش از ۴ پاتوزن به عنوان اهداف طیف وسیع مشخص شدند. در جستجوی مسیره‌های متابولیکی، اهداف پروتئینی در پایگاه KEGG بررسی شدند و مسیره‌های متابولیکی که این اهداف در آنها نقش دارند مشخص شدند (۱۳).

CELLO و PSORT محل تجمع اهداف شناسایی شده مشخص شد (۱۹،۳۲). محل‌های تجمع پروتئین در سلول باکتری‌های گرم منفی شامل سیتوپلاسم، غشاء داخلی، ناحیه پری پلاسمیک، غشاء خارجی و خارج سلول است. در جستجوی عملکردی، عملکرد اهداف پروتئینی با عملکرد ناشناخته با استفاده از ابزارهایی مانند Pfam، InterProScan و CDD شناسایی و مشخص شد (۸،۱۷). در جستجوی طیف وسیع، اهداف نهایی با ارزش مورد انتظار ۰/۰۰۱ علیه پایگاه داده اختصاصی متشکل از پروتئوم ۲۷ جنس

جدول ۲- کد پایگاه داده سفارشی انسان، فلور میکروبی دستگاه گوارش، مهره‌داران، بندپایان و نرم‌تنان

txid9606 [ORGN] OR txid411466 [ORGN] OR txid349741 [ORGN] OR txid445970 [ORGN] OR txid445971 [ORGN] OR txid411490 [ORGN] OR txid445972 [ORGN] OR txid411467 [ORGN] OR txid537012 [ORGN] OR txid470145 [ORGN] OR txid483217 [ORGN] OR txid483216 [ORGN] OR txid483215 [ORGN] OR txid471870 [ORGN] OR txid411476 [ORGN] OR txid483218 [ORGN] OR txid484018 [ORGN] OR txid449673 [ORGN] OR txid411479 [ORGN] OR txid367928 [ORGN] OR txid411481 [ORGN] OR txid518635 [ORGN] OR txid500634 [ORGN] OR txid518634 [ORGN] OR txid473819 [ORGN] OR txid205913 [ORGN] OR txid206672 [ORGN] OR txid1682 [ORGN] OR txid498739 [ORGN] OR txid511680 [ORGN] OR txid451640 [ORGN] OR txid518636 [ORGN] OR txid445973 [ORGN] OR txid411902 [ORGN] OR txid500633 [ORGN] OR txid428125 [ORGN] OR txid537013 [ORGN] OR txid500632 [ORGN] OR txid445974 [ORGN] OR txid411468 [ORGN] OR txid411489 [ORGN] OR txid411486 [ORGN] OR txid411484 [ORGN] OR txid428126 [ORGN] OR txid471871 [ORGN] OR txid411472 [ORGN] OR txid411903 [ORGN] OR txid521003 [ORGN] OR txid445975 [ORGN] OR txid470146 [ORGN] OR txid411474 [ORGN] OR txid411461 [ORGN] OR txid411462 [ORGN] OR txid479437 [ORGN] OR txid500639 [ORGN] OR txid428127 [ORGN] OR txid411469 [ORGN] OR txid428128 [ORGN] OR txid411463 [ORGN] OR txid411483 [ORGN] OR txid411485 [ORGN] OR txid362948 [ORGN] OR txid420247 [ORGN] OR txid521001 [ORGN] OR txid521002 [ORGN] OR txid483214 [ORGN] OR txid500635 [ORGN] OR txid387661 [ORGN] OR txid411477 [ORGN] OR txid411465 [ORGN] OR txid243265 [ORGN] OR txid537011 [ORGN] OR txid520999 [ORGN] OR txid521000 [ORGN] OR txid500637 [ORGN] OR txid451638 [ORGN].

انتخاب کرد و به مرحله بعد انتقال داد. به علت عدم تشابه بین ۳۴۷۷ پروتئین از پاتوزن با پروتئوم میزبان‌ها، هدف قرار دادن این پروتئین‌ها در پاتوزن هیچ‌گونه اثر مضر بر میزبان‌ها نخواهد گذاشت. با این وجود در میان این ۳۴۷۷ پروتئین ممکن است پروتئین‌های وجود داشته باشند که دارای مشابهت با پروتئین‌های انسان و موجودات غیرهدف باشند (۱۴،۳۰).

برای پیدا کردن این پروتئین‌ها و حذف اثرهای ناخواسته هدف-گیری آن‌ها روی انسان و موجودات غیرهدف چند مرحله دیگر از هم‌ردیفی انجام گرفت. ۳۴۷۷ پروتئین مرحله قبل با ارزش مورد انتظار ۰/۰۰۱ علیه پروتئوم انسان و فلور میکروبی دستگاه گوارش هم‌ردیف شدند. از ۳۴۷۷ پروتئین ورودی به هم‌ردیفی ۲۱۷۷ پروتئین به علت مشابهت قابل توجه به پروتئوم انسان و فلور میکروبی دستگاه گوارش حذف و ۱۳۰۰ پروتئین باقی‌مانده هیچ شباهتی با پروتئوم انسان و فلور میکروبی دستگاه گوارش نشان ندادند و برای مرحله بعدی آنالیز انتخاب شدند. تا این مرحله ۱۳۰۰ پروتئین از پاتوزن هیچ شباهتی به پروتئوم میزبان‌ها، انسان و فلور میکروبی دستگاه گوارش نشان ندادند. هدف‌گیری این ۱۳۰۰ پروتئین با اطمینان بالایی هیچ اثر مضر بر میزبان‌ها، انسان و فلور میکروبی دستگاه گوارش آن نخواهد داشت. با این وجود در میان این ۱۳۰۰ پروتئین ممکن است پروتئین‌هایی مشابه با پروتئین‌های موجودات غیرهدف وجود داشته باشند (۱۴،۳۰).

نتایج

ژنوم *P. syringae* ۵۲۲۰ ژن داشته و ۵۰۸۹ پروتئین تولید می‌کند. از ۵۰۸۹ پروتئین پاتوزن *P. syringae* تعداد ۲۵۳۶ پروتئین توسط رشته مثبت و ۲۵۵۳ پروتئین توسط رشته منفی کد می‌شوند. طول پروتئین‌های موجود در پاتوزن *P. syringae* از ۲۴ تا ۱۳۵۳۷ اسیدآمینو متغیر بوده و تعداد عمده پروتئین‌ها در محدوده ۱۰۰ تا ۵۰۰ اسیدآمینو قرار دارند. همچنین این پاتوزن دارای ۲۵۹ مسیر متابولیکی و غیرمتابولیکی برای فرآیندهای حیاتی مختلف است. مسیره‌های متابولیکی شامل متابولیسم انرژی، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، نوکلئوتیدها، آمینواسیدها، سایر آمینوها، گلیکان‌ها، ویتامین‌ها، کوفاکتورها و متابولیت‌های ثانویه هستند. مسیره‌های غیرمتابولیکی شامل مسیره‌های پردازش اطلاعات ژنتیکی، پردازش اطلاعات محیطی و پردازش سلولی هستند. تمامی مسیره‌های متابولیکی و غیر متابولیکی اصلی یاد شده دارای مسیره‌های فرعی و مسیره‌های زیر مجموعه‌ای هستند (۲۷،۲۳).

از ۵۰۸۹ پروتئین ورودی، ۱۶۱۲ پروتئین پاتوزن دارای مشابهت قابل توجهی با پروتئوم میزبان‌ها بودند که از آنالیز حذف شدند و ۳۴۷۷ پروتئین هیچ مشابهتی با پروتئوم میزبان‌ها نشان ندادند و برای مرحله بعدی آنالیز انتخاب شدند. در این مرحله پروتئین‌های مشابه با پروتئین‌های میزبان حذف شدند، بنابراین با اطمینان بالایی می‌توان بقیه پروتئین‌ها را به عنوان اهداف اولیه برای مبارزه

برای حذف اثرهای ناخواسته هدف‌گیری این پروتئین‌های مشابه بر موجودات غیرهدف، مرحله دیگری از هم‌ردیفی انجام شد و در آن ۱۳۰۰ پروتئین مرحله قبل با ارزش مورد انتظار ۰/۰۰۱ علیه پروتئوم موجودات غیرهدف شامل مهره‌داران، بندپایان و نرم‌تنان هم‌ردیف شدند. از ۱۳۰۰ پروتئین هم‌ردیف شده ۲۲۳ پروتئین داری مشابهت زیادی با پروتئوم موجودات غیرهدف بودند و حذف شدند. ۱۰۷۷ پروتئین باقی‌مانده پروتئین باقی‌مانده هیچ شباهتی با پروتئوم موجودات غیرهدف نداشتند و برای مرحله بعدی آنالیز انتخاب شدند. تا این مرحله ۱۰۷۷ پروتئین در پاتوژن شناسایی شده که هیچ شباهتی به پروتئوم میزبان‌ها، انسان، فلور میکروبی دستگاه گوارش و موجودات غیرهدفی مانند مهره‌داران، بندپایان و نرم‌تنان ندارند و هدف‌گیری آن‌ها هیچ اثر مضر روی این موجودات نخواهد داشت. با این حال، هدف‌گیری هر پروتئینی نمی‌تواند به‌طور مؤثری پاتوژن را کنترل کند، زیرا بسیاری از پروتئین‌ها برای پاتوژن ضروری نبوده و پاتوژن بدون آن‌ها نیز قابلیت زنده ماندن، رشد و تکثیر را خواهد داشت. برای کنترل مؤثر پاتوژن، باید پروتئین‌های حیاتی که ارگانسیم بدون آن‌ها توانایی زنده ماندن، رشد و تکثیر را از دست خواهد داد را هدف قرار داده شود. به این نوع پروتئین‌های حیاتی، پروتئین‌های ضروری گویند و ژن‌های کدکننده چنین پروتئین‌هایی را ژن‌های ضروری می‌نامند. بنابراین در مرحله آخر، ۱۰۷۷ پروتئین هدف با ارزش مورد انتظار ۰/۰۰۰۱ علیه پایگاه ژن‌های ضروری باکتریایی مورد هم‌ردیفی قرار گرفتند. از ۱۰۷۷ پروتئین مورد بررسی، ۹۸۲ پروتئین ضروری نبودند و از آنالیز حذف شدند و ۹۵ پروتئین که مشابهت بالایی با پروتئین‌های موجود در پایگاه ژن‌های ضروری نشان دادند، به‌عنوان اهداف بالقوه نهایی در پاتوژن *P.syringae* انتخاب شدند (جدول ۳ و ۴).

از ۹۵ هدف شناسایی شده، ۵۳ هدف توسط رشته مثبت و ۴۲ هدف توسط رشته منفی کد می‌شوند. هم‌چنین عمده اهداف شناسایی شده در محدوده طولی بین ۱ تا ۵۰۰ اسیدآمینوای قرار گرفته و روندی مشابه با تمام پروتئین‌های موجود در پاتوژن *P.syringae* دارند. ۹۵ هدف شناسایی شده دارای نقش‌های مختلفی در سلول پاتوژن *P.syringae* هستند. برخی اهداف در متابولیسم کربوهیدرات، انرژی، چربی، نوکلئوتیدها، آمینواسیدها، سایر آمین‌ها، گلیکان‌ها، ویتامین‌ها و کوفاکتورها و متابولیت‌های ثانویه دخالت دارند. برخی اهداف دارای نقش‌هایی در پردازش اطلاعات ژنتیکی و محیطی هستند و برخی در فرآیندهای سلولی نقش دارند. اهداف شناسایی شده در قسمت‌های مختلفی از سلول پاتوژن *P.syringae* تجمع پیدا می‌کنند. برخی اهداف دارای محل

تجمع سیتوپلاسمی هستند، برخی در غشاء داخلی مجتمع می‌شوند و برخی در فضای پری‌پلاسمیک تجمع دارند. غشاء خارجی و خارج سلول هم محل‌های تجمع برخی از اهداف هستند. به‌طور کلی از ۹۵ هدف شناسایی شده، ۵۹ هدف در سیتوپلاسم، ۱۵ هدف در غشاء داخلی، ۱۷ هدف در فضای پری‌پلاسمیک، ۳ هدف در غشاء خارجی و ۱ هدف در خارج سلول پاتوژن *P.syringae* تجمع پیدا می‌کنند (شکل ۲). تعیین محل استقرار پروتئین هدف یکی از مهم‌ترین مراحل در مبارزه با پاتوژن است. اهداف موجود در سیتوپلاسم و بخش‌های داخلی سلول پاتوژن اهداف مناسبی برای مبارزه شیمیایی هستند، درحالی‌که اهداف موجود در غشاء برای طراحی پلنتی بادی‌ها و تولید گیاهان تراریخت مقاوم بیان‌کننده این پلنتی بادی‌ها مناسب هستند. با توجه به نتایج آنالیز محل تجمع سلولی، بیش‌تر اهداف شناسایی شده به‌علت تجمع سیتوپلاسمی برای مبارزه شیمیایی مناسب هستند. عوامل شیمیایی طراحی شده علیه اهداف سیتوپلاسمی باید به سلول وارد شوند تا بتوانند هدف مورد نظر را نابود کنند. درحالی‌که آنتی‌بادی‌های تولید و ترشح شده توسط گیاهان تراریخت می‌توانند در فضای بین سلولی گیاه با اهداف موجود در بخش‌های خارجی سلول پاتوژن برهم‌کنش کرده و پاتوژن را غیرفعال کنند یا از بین ببرند. برخی از پروتئین‌های هدف شناسایی شده دارای عملکرد ناشناخته هستند، بنابراین، با استفاده از ابزارهایی مانند Pfam و CDD عملکرد آن‌ها مشخص شد. بیست و یک پروتئین هدف دارای دامنه DUF بودند و عملکرد آن‌ها هم-چنان ناشناخته باقی‌ماند. سایر دامنه‌های عملکردی شناسایی شده Zinc- or iron-chelating, Lipopolysaccharide kinase, domain, Cupin, Winged helix-turn helix, domain, Sigma-factor, ATPgrasp, ATPase, TarH domain, MacB-like periplasmic core, FtsX-like permease, domain, TonB, Lipopolysaccharide-assembly, Membrane protein, ZapA, GAF domain هستند. وجود دامنه‌های عملکردی مختلف در این پروتئین‌ها نشان‌دهنده فعالیت این پروتئین‌ها در فرآیندهای مختلف سلولی است. پروتئین‌هایی که عملکرد آن‌ها در این آنالیز مشخص شد دارای نقش‌های مختلفی در فرآیندهای متابولیسم کربوهیدرات‌ها، انرژی، چربی، نوکلئوتیدها، آمینواسیدها، سایر آمین‌ها، گلیکان‌ها، ویتامین‌ها، کوفاکتورها و متابولیت‌های ثانویه و پردازش اطلاعات ژنتیکی، محیطی و دیگر فرآیندهای سلولی بودند. دو هدف پروتئینی در سیستم دو جزئی باکتریایی دخیل هستند. با استفاده از سیستم دو جزئی، پاتوژن به محرک‌های محیطی پاسخ داده و بر اساس آن

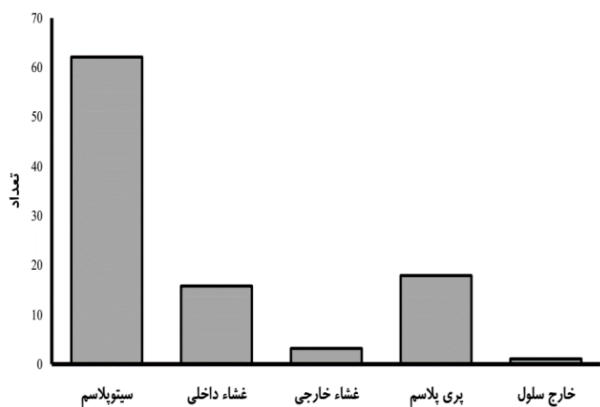
پروتئینی دارای نقش تنظیم‌کنندگی در بیان ژن هستند و بیان گروه‌های خاصی از ژن‌ها را تنظیم می‌کنند. هدف‌گیری پروتئین‌های تنظیمی ممکن است باعث مختل کردن بیان تعداد زیادی از ژن‌هایی شود که به‌وسیله آن پروتئین خاص تنظیم می‌شوند. سه هدف پروتئینی در تقسیم سلولی پاتوژن دخیل هستند و هدف قرار دادن آن‌ها ممکن است باعث اختلال در تولید مثل سلول باکتری شده و به‌طور مؤثری باعث کنترل پاتوژن شود.

شرایط درونی سلول خود را تنظیم می‌کند. این سیستم هم‌چنین در بیماری‌های زایی پاتوژن نقش دارد و به‌علت عدم وجود آن در یوکاریوت‌ها و انسان هدف مناسبی برای مبارزه است (۶). دوازده هدف پروتئینی دارای نقش در انتقال مواد به داخل و خارج سلول پاتوژن هستند و به‌عنوان پمپ، کانال و ناقل عمل می‌کنند. هدف‌گیری چنین پروتئین‌هایی باعث اختلال در نقل و انتقال مواد در سلول پاتوژن شده و باعث از بین رفتن آن خواهد شد. پنج هدف

جدول ۳- تعداد پروتئین‌های ورودی، خروجی و حذف شده در هر مرحله آنالیز

تعداد خروجی	تعداد حذف شده	تعداد ورودی	نوع آنالیز
۳۴۷۷	۱۶۱۲	۵۰۸۹	هم‌ردیفی با پایگاه داده اختصاصی میزبان‌ها
۱۳۰۰	۲۴۰۰	۳۴۷۷	هم‌ردیفی با پایگاه داده اختصاصی انسان و فلور میکروبی دستگاه گوارش
۱۰۷۷	۲۲۳	۱۳۰۰	هم‌ردیفی با پایگاه داده اختصاصی مهره‌داران، بندپایان و نرم تنان
۹۵	۹۸۲	۱۰۷۷	آنالیز ضروری بودن

درحالی‌که هدف‌گیری هم‌زمان چند مسیر احتمال ایجاد مقاومت در پاتوژن را تا حد زیادی کاهش می‌دهد. پروتئین‌هایی که در چند مسیر متابولیکی مختلف نقش دارند اهداف مناسب‌تری برای مبارزه هستند زیرا هدف‌گیری چنین پروتئین‌هایی باعث ایجاد اختلال در چند مسیر متابولیکی سلول شده و به‌طور مؤثرتری باعث از بین رفتن پاتوژن خواهد شد (۱۱،۲۶).



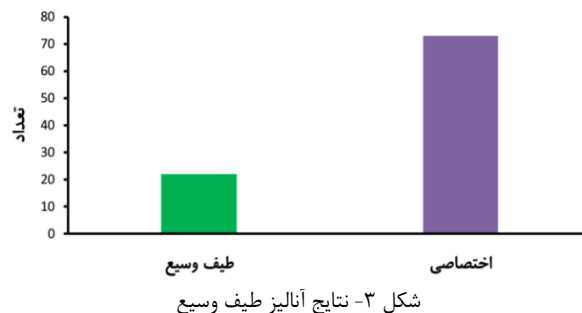
شکل ۲- محل تجمع اهداف بالقوه پیش‌بینی شده

در آنالیز طیف وسیع ۲۲ مورد از اهداف شناسایی شده در دسته‌بندی طیف وسیع قرار گرفتند و ۷۳ مورد باقی‌مانده به‌عنوان اهداف اختصاصی پاتوژن *P.syringae* در نظر گرفته شدند (شکل ۳).

یکی از مهم‌ترین و سودمندترین ویژگی‌های یک هدف برای مبارزه، طیف وسیع بودن آن است به این معنی که این هدف در طیف وسیعی از دیگر پاتوژن‌ها با شباهت بالا موجود بوده و محافظت شده باشد. از ۹۵ هدف شناسایی شده ۲۲ هدف طیف وسیع و ۷۳ هدف اختصاصی پاتوژن *P.syringae* بودند. مزیت پروتئین‌های هدف طیف وسیع این است که با هدف‌گیری آن‌ها می‌توان طیف وسیعی از پاتوژن‌ها را هدف قرار داد و از حمله و صدمه آن‌ها به گیاه جلوگیری کرد. هم‌چنین هدف‌گیری چنین اهدافی باعث کاهش قابل توجهی در وقت و هزینه مبارزه با دیگر پاتوژن‌ها خواهد شد. از طرفی در مبارزه شیمیایی می‌توان با سم تولید شده علیه این اهداف طیف وسیع، پاتوژن‌های مختلفی را از بین برد بدون اینکه نیاز به تولید سم اختصاصی برای هر پاتوژن باشد.

جستجو در پایگاه KEGG نشان داد که اهداف پیش‌بینی شده در مسیرهای متابولیکی حیاتی مختلفی از جمله متابولیسم کربوهیدرات‌ها، متابولیسم انرژی، متابولیسم اسیدهای آمینه دخیل هستند. از طرف دیگر برخی اهداف در مسیرهای تنظیمی به‌عنوان فاکتورهای تنظیمی بیان ژن نقش دارند و برخی در سیستم‌های نقل و انتقال مواد به درون و بیرون سلول نقش اساسی ایفا می‌کنند (۱۳).

از ۹۵ پروتئین هدف شناسایی شده تنها یک پروتئین در بیش از یک مسیر متابولیکی نقش داشت. در سلول، برخی پروتئین‌ها تنها در یک مسیر متابولیکی نقش دارند و برخی دیگر در بیش از یک مسیر متابولیکی نقش بازی می‌کنند. هدف قرار دادن یک مسیر متابولیکی خاص باعث ایجاد سریع مقاومت در پاتوژن‌ها خواهد شد



بحث و نتیجه گیری

بیماری‌های گیاهی همواره در طول تاریخ تهدید مهمی علیه محصول‌های کشاورزی تولیدی انسان‌ها بوده و کوچک‌ترین غفلت بشر از حضور آن‌ها در مقطعی باعث از بین رفتن تا صد درصد محصول شده است. لذا کنترل این عوامل خسارت‌زا اجتناب ناپذیر است. بیماری‌های باکتریایی یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد خسارت بر محصول‌های کشاورزی هستند. مبارزه با بیماری‌های باکتریایی به‌طور معمول پیچیده‌تر است و در مبارزه با این عوامل بیماری‌زا کمابیش از چندین روش مبارزه به‌صورت تلفیقی استفاده می‌شود. با این وجود، مبارزه شیمیایی هنوز قوی‌ترین و مؤثرترین روش مبارزه است. طی یک‌صد سال گذشته، کنترل بیماری‌ها و سایر آفات گیاهی به‌طور فزاینده‌ای به‌استعمال مواد شیمیایی سمی وابسته بوده است. کنترل بیماری‌های گیاهی استعمال این مواد سمی را نه تنها بر روی گیاه و محصول‌های گیاهی مورد مصرف ما، بلکه در داخل خاک جایی که بسیاری از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا زندگی کرده و به ریشه گیاه حمله می‌کنند، نیز ضروری ساخته است. ثابت شده که بسیاری از این مواد شیمیایی برای میکروارگانیسم‌های غیر هدف، حیوانات و حتی برای انسان نیز ممکن است سمی باشند. دشوار است که بتوان هزینه‌های بلند مدت و کوتاه مدت آلودگی محیط‌زیست بر سلامت و بهزیستی انسان را که بر اثر تلاش ما برای کنترل بیماری‌های گیاهی و سایر آفات به وجود می‌آید، تخمین زد.

مهم‌ترین مشکل مواد شیمیایی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر سموم شیمیایی که برای کنترل بیماری‌های باکتریایی در مقیاس وسیع استفاده می‌شوند، وجود مولکول‌های هدف مشابه با میزبان و سایر موجودات غیرهدف است. مولکول‌های هدف این مواد شیمیایی در پاتوژن که به‌طور عمومی مولکول‌های پروتئینی هستند، در اغلب موارد دارای همولوگ‌های بسیار مشابهی در میزبان پاتوژن و موجودات غیرهدف هستند. هدف‌گیری این اهداف توسط مواد شیمیایی متداول باعث آسیب ناخواسته به میزبان و موجودات

غیرهدفی مانند انسان خواهد شد. کمابیش تمام مواد شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌هایی که برای مبارزه با بیماری‌های باکتریایی گیاهی به کار می‌روند دارای اهدافی در پاتوژن هستند که شباهت بالایی با میزبان، انسان و سایر موجودات غیرهدف دارد.

در پژوهش حاضر از روشی استفاده شد که در آن با چند مرحله هم‌ردیفی متوالی اهداف پروتئینی به‌دست آمد که هیچ شباهتی با میزبان و موجودات غیرهدف نداشتند (۵،۱۵،۲۵،۲۷،۲۸). در مرحله اول پروتئین‌هایی انتخاب شدند که هیچ شباهتی با پروتئین‌های میزبان‌های گیاهی نداشتند. تا این مرحله میزبان‌ها از اثرهای ناخواسته هدف‌گیری در امان می‌مانند اما دیگر موجودات غیرهدف مانند انسان هم‌چنان در معرض اثرهای مضر ناخواسته هدف‌گیری هستند. در مرحله بعدی، پروتئین‌هایی باقی ماندند که هدف‌گیری آن‌ها هیچ اثر جانبی مضر بر میزبان‌ها، انسان، فلور میکروبی دستگاه گوارش، مهره‌داران، بندپایان و نرم‌تنان نخواهد داشت. اما هدف‌گیری این پروتئین‌ها ممکن است اثر قابل توجهی بر پاتوژن نداشته باشد، که به‌علت ضروری و حیاتی نبودن چنین پروتئین‌هایی است. برای حل این مشکل، آنالیز ضروری بودن انجام و تنها ۹۵ پروتئین ضروری و حیاتی تشخیص داده شدند. این ۹۵ پروتئین اهداف نهایی را تشکیل داده و مورد آنالیزهای تکمیلی قرار گرفتند. آنالیزهای تکمیلی محل تجمع، عملکرد پروتئین‌های با عملکرد ناشناخته و مسیرهای متابولیکی که پروتئین در آن‌ها دخیل هستند را مشخص کرد. علاوه‌براین پروتئین‌های هدفی که علاوه‌بر پاتوژن *P. syringae* پاتوژن‌های گیاهی دیگر حضور داشتند را معین نمود. در نهایت این ۹۵ پروتئین، اهدافی به‌طور کامل اختصاصی و مشترک در بسیاری از پاتوژن‌های گیاهی بوده که در فرآیندهای بسیار حیاتی سلول نقش دارند و برای بقاء پاتوژن ضروری هستند. این پروتئین‌ها در بخش‌های مختلفی از سلول تجمع دارند که باعث آزادی عمل در انتخاب نوع سموم شیمیایی می‌شود. این اهداف در مسیرهای متابولیکی حیاتی پاتوژن نقش داشته و هدف‌گیری آن‌ها باعث مختل شدن این مسیرها و از بین رفتن پاتوژن می‌شود. این اهداف در محل‌های مختلفی مانند سیتوپلاسم، غشاء داخلی، غشاء خارجی، پری‌پلاسم و خارج سلول تجمع پیدا می‌کنند. اهداف موجود در پری‌پلاسم، غشاء خارجی، غشاء داخلی و خارج سلول برای هدف‌گیری توسط مولکول‌هایی مانند پلنتی‌بادی‌ها مناسب هستند و می‌توان گیاهان تراریختی با بیان آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه این اهداف تولید کرد. چنین گیاهانی می‌توانند به‌طور مؤثری در مقابل پاتوژن‌های تولیدکننده این اهداف مقاوم باشند. اهداف موجود در سیتوپلاسم برای هدف‌گیری توسط عوامل ضد میکروبی مناسب هستند. عوامل

غیرهدف و هم‌چنین محیط‌زیست خواهد شد و سلامت آن‌ها را به خطر خواهد انداخت.
باتوجه به گسترش روز افزون اطلاعات و داده‌های بیولوژیک و پیشرفت نرم‌افزارها و روش‌های محاسبه‌ای استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی می‌تواند به‌طور مؤثری زمان و هزینه‌های مطالعه-های آزمایشگاهی را کاهش دهد.

سپاسگزاری

مقاله حاضر بخشی از نتایج طرح پژوهشی است که بودجه آن از طرف دانشگاه آزاد اسلامی واحد کنگاور تأمین شده است که بدین ترتیب تشکر و قدردانی می‌گردد.

ضدمیکروبی که علیه این اهداف تولید می‌شوند، با توجه به عدم مشابهت این پروتئین‌ها با پروتئین‌های موجودات غیرهدف، ترکیب‌هایی کامل اختصاصی بوده و علاوه بر کنترل مؤثر پاتوژن برای محیط‌زیست و موجودات غیرهدف نیز اثر مضرى ندارند. اهداف شناسایی شده به دو گروه طیف وسیع و اختصاصی تقسیم می‌شوند. اهداف طیف وسیع موارد مناسب‌تری برای هدف‌گیری هستند. از آنجای‌که اهداف طیف وسیع پاتوژن‌های بیش‌تری را هدف‌گیری می‌کنند، اهداف مؤثرتری برای مبارزه به‌نظر می‌رسند و با هدف‌گیری آن‌ها با یک‌بار صرف هزینه می‌توان گیاه را نسبت به طیف وسیعی از پاتوژن‌ها مقاوم کرد. هم‌چنین سمومی که علیه این اهداف تولید می‌شوند طیف وسیعی از پاتوژن‌ها را از بین می‌برند. از طرفی دیگر، سمومی که علیه اهداف بالقوه تولید می‌شوند، سمومی بی‌خطر برای انسان، موجودات غیرهدف و محیط‌زیست هستند زیرا پروتئین هدف آن‌ها تنها در پاتوژن‌های ویژه وجود دارد.

با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی مبتنی بر همولوژی می‌توان فرآیند تولید گیاهان تراریخت مقاوم به بیماری‌ها و آفات و هم-چنین فرآیندهای تولید سموم شیمیایی را به‌طور قابل توجهی کوتاه کرد و هزینه‌های آن را کاهش داد. با استفاده از این روش‌ها هم‌چنین می‌توان ایمنی سموم تجاری تولید شده را بررسی و ارزیابی کرد. مهم‌ترین مزیت استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی و محاسبه‌ای، پیش‌بینی اهدافی در پاتوژن‌هاست که برای بقاء پاتوژن‌ها ضروری بوده و در عین حال هیچ شباهتی با میزبان و موجودات غیرهدف ندارند و هدف قرار دادن آن‌ها اثر سوء بر میزبان و سایر موجودات غیرهدف نخواهد داشت. در صورتی‌که سایر اهداف که با روش‌های غیر بیوانفورماتیکی انتخاب می‌شوند ممکن است برای بقاء پاتوژن ضروری نبوده و از طرفی دارای توالی مشابه در میزبان و موجودات غیرهدف باشند. هدف‌گیری چنین پروتئین‌هایی باعث اثرهای مضر بر میزبان، انسان و موجودات

منابع

1. Agrios, G.N., Plant pathology, 2005. Elsevier Academic Press Burlington, MA.
2. Altschul, S.F., et al., Basic local alignment search tool. Journal of molecular biology, 1990. 215: p. 403-410.
3. Anishetty, S., et al., Potential drug targets in Mycobacterium tuberculosis through metabolic pathway analysis. Computational biology and chemistry, 2005. 29: p. 368-378.
4. Buell, C.R., et al., The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *P. syringae* pv. tomato DC3000. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. 100: p. 10181-10186.
5. Butt, A.M., et al., Correction: Comparative Genomics Analysis of Mycobacterium ulcerans for the Identification of Putative Essential Genes and Therapeutic Candidates. PloS one, 2013. 8.
6. Capra, E.J. and Laub, M.T. The Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. Annual review of microbiology, 2012. p. 66: 325.
7. Chen, L., et al., update: toward the genetic diversity and molecular evolution of bacterial virulence factors. Nucleic acids research, 2012. gkr989.
8. Finn, R.D., et al., Pfam: the protein families database. Nucleic acids research, 2012. gkt1223.
9. Hirano, S.S. and Upper, C.D., Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. Annual review of phytopathology, 1990. 28: 155-177.
10. Horner, D.S., et al., Bioinformatics approaches for genomics and post genomics applications of next-generation sequencing. Briefings in bioinformatics, 2009. 11: p. 181-197.
11. Huthmacher, C., et al., Antimalarial drug targets in *Plasmodium falciparum* predicted by stage-specific metabolic network analysis. BMC systems biology, 2010. 4: 1.
12. Jones, P., et al., InterProScan 5: genome-scale protein function classification. Bioinformatics, 2014. 30: p. 1236-1240.
13. Kanehisa, M. and Goto, S., KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic acids research, 2000. 28: p. 27-30.
14. Koch, L., Microbiome: Shaping the gut microbiome. Nature Reviews Microbiology, 2005. p. 13: 4-4.
15. Lewis, K., Platforms for antibiotic discovery. Nature reviews Drug discovery, 2013. 12: p. 371-387.
16. Luo, H., et al., DEG 10, an update of the database of essential genes that includes both protein-coding genes and noncoding genomic elements. Nucleic acids research, 2014. 42: D574-D580.
17. Marchler-Bauer, A., et al., CDD: NCBI's conserved domain database. Nucleic acids research, 2014. gku1221.
18. Mochida, K. and Shinozaki, K., Genomics and bioinformatics resources for crop improvement. Plant and Cell Physiology, 2010. 51: p. 497-523.
19. Nancy, Y.Y., et al., PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. Bioinformatics, 2010. 26: p. 1608-1615.
20. NCBI, R.C., Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic acids research, 2015. 43: D6.
21. Parker, J., et al., Quantitative proteomics of tomato defense against *P. syringae* infection. Proteomics, 2013. p. 13: 1934-1946.
22. Pevsner, J., Bioinformatics and functional genomics, 2015. John Wiley & Sons.
23. Raman, K., et al., targetTB: a target identification pipeline for Mycobacterium tuberculosis through an interactome, reactome and genome-scale structural analysis. BMC systems biology, 2008. 2: 1.
24. Sahu, S.S., et al., Predicting genome-scale Arabidopsis-*P. syringae* interactome using domain and interolog-based approaches. BMC bioinformatics, 2014. 15: S13.
25. Sakharkar, K.R., et al., A novel genomics approach for the identification of drug targets in pathogens, with special reference to *Pseudomonas aeruginosa*. In silico biology, 2004. 4: p. 355-360.
26. Sarkar, M., et al., In silico quest for putative drug targets in *Helicobacter pylori* HPAG1: molecular modeling of candidate enzymes from lipopolysaccharide biosynthesis pathway. Journal of molecular modeling, 2012. p. 18: 1855-1866.
27. Shanmugham, B. and Pan, A., Identification and characterization of potential therapeutic candidates in emerging human pathogen Mycobacterium abscessus: a novel hierarchical in silico approach, 2013. PloS one, 8.

28. Shanmugham, B. and Pan, A., Identification and characterization of potential therapeutic candidates in emerging human pathogen *Mycobacterium abscessus*: a novel hierarchical in silico approach, 2012. PloS one, 8: e59126.
29. Strange, R.N. and Scott, P.R., Plant disease: a threat to global food security. *Phytopathology*, 2005. 4: 3.
30. Walter, J. and Ley, R., The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. *Annual review of microbiology*, 2011. 65: 411-429.
31. Yaish, M.W., et al., Genetic mapping of quantitative resistance to race 5 of *P. syringae* pv. *phaseolicola* in common bean. *Euphytica*, 2006. 152: p. 397-404.
32. Yu, C.-S., et al., CELLO2GO: a web server for protein subcellular localization prediction with functional gene ontology annotation. 2014.