

آنالیز توالی‌های کد شونده ژن‌های *GAI* و *PIP2* گردو و مقایسه آن با سایر گیاهان در شرایط *in silico*

مهدی محسنی آذر^۱ - مسعود توحیدفر^۲ - کورش وحدتی^{۳*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۰۸

چکیده

صفت پاکوتاهی از جمله صفات مهم در اصلاح گیاهان زراعی و باغی محسوب می‌شود. استفاده از پایه‌های پاکوتاه در درختان میوه، افزایش عملکرد در واحد سطح و تسهیل در عملیات زراعی و داشت را به دنبال دارد. ژن‌های متعددی در بروز این صفت دخیل هستند. جهش در دو ژن *GAI* و *PIP2* با دو مکانیسم مختلف در بروز صفت پاکوتاهی در برخی گونه‌های گیاهی نقش دارند. در این مطالعه، آنالیز *in silico* و فیلوژنتیکی ژن‌های *GAI* و *PIP2* از نظر تعداد اسید آمینه، ساختار دوم و سوم و محل تغییرات پس از ترجمه، تعداد اگزون و اینترون، هدف‌گیری^۴ و عملکرد آن‌ها بررسی شد. در بررسی فیلوژنتیکی بین ۱۷ گونه مختلف، گونه گردو بر اساس توالی ژنومی و پروتئینی هر دو ژن *GAI* و *PIP2* از نظر تکاملی همان‌طور که انتظار می‌رفت، در گروه گیاهان دو لپه و چوبی قرار گرفت. با انجام هم‌ردیفی‌های چندگانه^۵ و بررسی نواحی حفاظت شده این ژن‌ها در گیاهان، مشخص گردید که بین این ژن‌ها به رغم تفاوت در طول cDNA شباهت زیادی خصوصاً در نواحی حفاظت شده، ساختار دو بعدی و سه بعدی وجود دارد. با استفاده از نرم افزار PSIPRED، در ساختار دو بعدی پروتئین، هلیکس‌ها و صفحات بتا برای هر دو ژن مشخص شد. در مقایسه ساختار سه بعدی پروتئین *PIP2* گردو، مشابه‌ترین پروتئین، زنجیره A پروتئین *PIP2* اسفناج (*Spinacia oleracea*) به دست آمد. همچنین با مقایسه ساختار سه بعدی پروتئین *GAI* گردو در بانک PDB مشابه‌ترین ساختار مربوط به زیرواحد بتای پروتئین *GAI* آرابییدوپسیس^۶ بدست آمد، که ۴۸ درصد در ناحیه دومین DELLA شباهت داشت. با آنالیز هدف‌گیری و تعیین تعداد اگزون و اینترون مشخص شد که ژن *GAI* دارای یک اگزون و بدون اینترون و دارای هدف‌گیری هسته‌ای و ژن *PIP2* دارای ۴ اگزون و ۳ اینترون بود که هدف‌گیری آن در غشا سیتوپلاسمی سلول قرار دارد. همچنین نتایج، تجزیه Tcoffee نشان داد که ژن *PIP2* نسبت به *GAI* در طول تکامل در بین گونه‌های گیاهی بسیار حفاظت شده‌تر است.

واژه‌های کلیدی: پاکوتاهی، تجزیه فیلوژنتیکی، ژن *GAI*، ژن *PIP2*، هم‌ردیفی

مقدمه

میوه مانند گردو *Juglans regia* هنوز پایه پاکوتاه کننده‌ای اصلاح نشده است. بررسی اولیه در خصوص ژن‌های دخیل در پاکوتاهی در برخی گیاهان و مقایسه توالی‌های آن با گردو می‌تواند اطلاعات خوبی برای اصلاح و انتخاب پایه‌های کوتاه کننده، دستکاری ژنتیکی و انتقال ژن برای ایجاد پاکوتاهی در گردو ارائه نماید. ژن‌های متعددی در بروز صفت پاکوتاهی در گیاهان دخیل هستند. از جمله این ژن‌ها ژن *GAI* و *PIP2* را می‌توان نام برد. ژن *GAI* از ژن‌های مسیر انتقال پیام^۷ جیبرلین است. جیبرلین‌ها جزو هورمون‌های گیاهی و مولکول‌های دی‌ترینوئید حلقوی هستند که در فرآیندهای مختلف و ضروری رشد و نمو گیاهان، از جمله جوانه زنی، بذر، طویل شدن محور زیر لپه، رشد ساقه، گسترش برگ، گل‌آغازی و توسعه اندام گل نقش

استفاده از گیاهان پاکوتاه برای کنترل رشد گیاه یکی از برنامه‌های غالب در اصلاح گیاهان است. به‌طور کلی گیاهان پاکوتاه بازده انرژی و تولید بیشتری نسبت به گیاهان بزرگ دارند. پایه‌های پاکوتاه کننده در سیب و برخی درختان میوه از سال‌ها پیش بوجود آمده که باعث افزایش عملکرد در واحد سطح شده است ولی در برخی از درختان

۱ و ۳- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی گیاهان باغی و استاد گروه باغبانی، دانشگاه تهران- پردیس اهوریحان
(*) نویسنده مسئول: kvahdati@ut.ac.ir (Email: kvahdati@ut.ac.ir)
۲- دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

4 - Targeting
5 - Multiple alignment
6 - Arabidopsis thaliana

بانک ژن در دسترس بودند از بانک اطلاعات NCBI^۶ به آدرس (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) دریافت شد. ویژگی توالی‌های گونه‌های مورد بررسی به همراه طول cDNA، طول mRNA و پروتئین، همچنین شماره دسترسی توالی‌ها در بانک NCBI در جدول یک و سه آورده شده است. سپس برنامه Tcoffee برای آدرس (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>) برای هم‌ردیفی چندگانه توالی‌ها به کار رفت و برای محاسبه ماتریس تشابه و رسم درخت فیلوژنتیکی از نرم افزار 4 MEGA استفاده شد. برای مشخص کردن تعداد اگزون و اینترون توالی‌ها با توجه به این که ژنوم گردو تا تاریخ انجام این تحقیق به طور کامل توالی یابی نشده است از گونه‌های مشابهی که توالی ژنوم آن‌ها مشخص شده استفاده گردید. نرم افزار Genescan برای آدرس (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) برای این منظور بکار رفت. همچنین با استفاده از بانک SWISSPROT مشخصات و عملکرد پروتئین‌ها پیش‌بینی شد. برای پیش‌بینی ساختار ثانویه پروتئین‌ها از نرم افزار PSIPRED^۷ به آدرس (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) استفاده شد. برای پیش‌بینی ساختار سه بعدی پروتئین، عملکرد و هدف‌گیری پروتئین برتریب از بانک Structure، و بانک TargetP^۸ به آدرس (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) استفاده شد. و از بانک SMART دامین‌های موجود در پروتئین‌ها و کارکرد آن‌ها بدست آمد. از برنامه VAST پروتئین برای هم‌ردیفی ساختار سوم پروتئین‌ها استفاده شد. برای این منظور بانک PDB به عنوان نوع بانک اطلاعات در BLAST پروتئین انتخاب گردید. و پروتئین مشابه از نظر ساختار سوم شناسایی شد.

نتایج و بحث

بررسی فیلوژنتیکی یک ژن بر اساس توالی‌های کد شونده در بین گونه‌های گیاهی روشی است که برای پی بردن به جهش‌های احتمالی در طول تکامل و در بین گونه‌ها استفاده شده است (۶ و ۹). نتایج هم‌ردیفی توالی‌های mRNA با استفاده از نرم افزار MEGA4 و همچنین Tcoffee نقاط حفاظت شده^۷، دامین‌ها و توالی نوکلئوتیدها و اسید آمینه‌هایی را که در طول تکامل هیچ تغییری نکرده بودند را بخوبی مشخص کرد. همچنین نواحی که در بین گونه‌های مختلف حذف یا اضافه شده بودند معلوم شد. نتایج نشان داد که ژن *PIP2* نسبت به ژن *GAI* در طول تکامل در بین گونه‌های گیاهی بسیار حفاظت شده‌تر است (شکل ۱ و ۵). همچنین آنالیز

دارند (۱۲، ۷ و ۱۵). علاوه بر آن در بلوغ باروری و در بقاء در محیط نامطلوب نقش دارند (۱). ژن *GAI* پروتئینی را کد می‌کند که دارای یک دامین^۱ حفاظت شده به نام DELLA است. پروتئین‌های DELLA، نام خود را از دنباله حفاظت شده اسیدآمینه‌های D-E-L-L-A، که بعد از N-ترمینال قرار دارند گرفته‌اند و در اصل به عنوان تنظیم کننده منفی رشد ناشی از *GA*^۲ و زیر مجموعه‌ای از خانواده فاکتور رونویسی GRAS هستند (۳). جهش در این ژن‌ها و خصوصاً دامین DELLA باعث کاهش شدید رشد در گیاهان می‌شود. (۲، ۵). ژن *PIP2*^۳ یکی از ژن‌های کدکننده پروتئین‌های آکوپورین^۴ است. آکوپورین‌ها پروتئین‌های غشایی از یک خانواده بزرگ از پروتئین‌های درونی^۵ MIP هستند که منافذ غشاء سلول‌های بیولوژیکی را تشکیل می‌دهند. آکوپورین‌ها به‌طور انتخابی مولکول‌های آب را به داخل و خارج از سلول هدایت می‌کنند، درحالی‌که از عبور یون‌ها و املاح دیگر جلوگیری می‌کنند. همچنین به عنوان پروتئین تلیفیک شونده منافذ غشاء است. در زیتون و هلو ثابت شده است که جهش و تغییر در بیان این ژن‌ها یکی از عوامل پاکوتاهی است (۱۱ و ۱۴). با وجودی که ژن‌های *GAI* و *PIP2* نقش مهمی در فرایند رشد و نمو بازی می‌کنند ولی ویژگی‌هایی مانند روابط تکاملی، ساختمان ژن، و نقش پروتئین، برای این ژن‌ها به‌طور کافی بررسی نشده است، با این حال، این روابط برای درک ویژگی ژن‌های *GAI* و *PIP2* حیاتی هستند. امروزه بررسی‌ها و تجزیه تحلیل‌های بیوانفورماتیکی قبل از اقدام و اجرای آزمایش‌های زمان بر و پرهزینه اصلاحی و مهندسی ژنتیک در گیاهان و خصوصاً درختان میوه که احتیاج به طرح‌های بلند مدت ۲۰ تا ۲۵ ساله دارد بسیار مفید بوده و توصیه می‌شود. بررسی‌ها و آنالیزهای مشابهی بر روی برخی ژن‌هایی که در بعضی مسیرهای بیوشیمیایی نقش دارند مانند ژن *SOS1* (۹) و ژن *HMGR* (۶) انجام گرفته است.

هدف از این تحقیق بررسی *in silico* دو ژن *PIP2* و *GAI* از ژن‌های دخیل در پاکوتاهی، در برخی از گیاهان مهم زراعی و باغی از جمله گردو است. علاوه بر آن تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک آن‌ها و مشخص کردن عملکرد، ساختمان دوم و سوم پروتئین، تغییرات پس از ترجمه، هدف‌گیری و بررسی آنالیزهای بیوانفورماتیکی در راستای تعیین مشخصات این ژن‌ها از اهداف دیگر این تحقیق بود.

مواد روش‌ها

توالی‌های mRNA ژن *GAI* و *PIP2* از موجودات مختلف که در

- 1- Domain
- 2- Gibberellin
- 3- Plasmamembran Intrinsic protein 2
- 4-Aquaporin
- 5- Major Intrinsic Protein

6- National Center for Biotechnology Information
7- Conserve

فیلوژنتیک نشان داد که ژن *GAI* را می‌توان به چهار گروه مختلف، از جمله بریوفیت‌ها، گونه *Medicago truncatula*، تک لپه و دولپه‌ها گروه‌بندی کرد (شکل ۳). دو لپه‌ها خود به دو زیر گروه گیاهان چوبی و علفی تقسیم می‌شوند.

جدول ۱ - تشریح توالی‌های ژن *GAI* در گونه‌های مختلف گیاهی
Table 1- Description of *GAI* gene sequences in different plant species

| شماره دسترسی .Accession No | طول mRNA Length (bp) | طول cDNA Length (bp) | طول پروتئین Protein length (aa) | خانواده Family | گونه Species | |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---|-------------------|-----------------|--|
| 1 | NM_101361 | 2129 | 1601 | 533 | Brassicaceae | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| 2 | HQ834311 | 2295 | 1772 | 590 | Vitaceae | <i>Vitis vinifera</i> |
| 3 | XM_002312414 | 2257 | 1802 | 602 | Salicaceae | <i>Populus trichocarpa</i> |
| 4 | AJ242530 | 1890 | 1890 | 630 | Poaceae | <i>Zea mays</i> |
| 5 | NM_001254019 | 1859 | 1571 | 523 | Fabaceae | <i>Glycine max</i> |
| 6 | XM_002533984 | 2115 | 1703 | 567 | Euphorbiaceae | <i>Ricinus communis</i> |
| 7 | XM_003636612 | 1611 | 1611 | 536 | Fabaceae | <i>Medicago truncatula</i> |
| 8 | AY208992 | 2041 | 1613 | 537 | Malvaceae | <i>Gossypium hirsutum</i> |
| 9 | NM_001247436 | 2145 | 1766 | 588 | Solanaceae | <i>Solanum lycopersicum</i> |
| 10 | XM_002458187 | 1684 | 1479 | 492 | Poaceae | <i>Sorghum bicolor</i> |
| 11 | JN941594 | 1644 | 1644 | 547 | Rosaceae | <i>Malus x domestica</i> <i>spur-type</i> |
| 12 | JF766606 | 2361 | 1841 | 613 | Juglandaceae | <i>Juglans regia</i> |
| 13 | AY464568 | 1482 | 1482 | 493 | Poaceae | <i>Oryza sativa</i> |
| 14 | FJ535244 | 1911 | 1911 | 636 | Rosaceae | <i>Malus baccata var. xiaojinensis</i> |
| 15 | XM_001757014 | 1011 | 1011 | 336 | Funariaceae | <i>Physcomitrella patens</i> |
| 16 | HQ834196 | 2491 | 1907 | 635 | Rosaceae | <i>Malus x domestica</i> |
| 17 | FJ594773 | 2147 | 1688 | 562 | Gesneriaceae | <i>Sinningia speciosa</i> |

جدول ۲ - تشریح توالی‌های ژن *PIP2* در گونه‌های مختلف
Table 2- Description of *PIP2* gene in different species

| شماره دسترسی .Accession No | طول mRNA Length (bp) | طول cDNA Length (bp) | طول پروتئین Protein length (aa) | خانواده Family | گونه Species | |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---|-------------------|-----------------|------------------------------|
| 1 | AY044327 | 956 | 864 | 281 | Brassicaceae | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| 2 | AY823263 | 1216 | 854 | 284 | Vitaceae | <i>Vitis vinifera</i> |
| 3 | AF118383 | 1026 | 851 | 283 | Brassicaceae | <i>Brassica napus</i> |
| 4 | AF326491 | 1171 | 872 | 290 | Poaceae | <i>Zea mays</i> |
| 5 | AY907701 | 956 | 863 | 287 | Fabaceae | <i>Glycine max</i> |
| 6 | AB377269 | 950 | 854 | 284 | Poaceae | <i>Hordeum vulgare</i> |
| 7 | AY059380 | 973 | 863 | 287 | Fabaceae | <i>Medicago truncatula</i> |
| 8 | AF139815 | 1235 | 773 | 257 | Poaceae | <i>Triticum aestivum</i> |
| 9 | DQ294252 | 1046 | 851 | 283 | Solanaceae | <i>Solanum tuberosum</i> |
| 10 | JF706350 | 2635 | 858 | 285 | Caryophyllaceae | <i>Dianthus caryophyllus</i> |
| 11 | JF834203 | 990 | 845 | 281 | Rosaceae | <i>Malus prunifolia</i> |
| 12 | AY189973 | 1278 | 863 | 287 | Juglandaceae | <i>Juglans regia</i> |
| 13 | AY189974 | 1278 | 863 | 287 | Juglandaceae | <i>Juglans regia</i> |
| 14 | KF033671 | 1269 | 863 | 287 | Fabaceae | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| 15 | GQ479824 | 955 | 836 | 278 | Euphorbiaceae | <i>Hevea brasiliensis</i> |
| 16 | EF126757 | 843 | 843 | 280 | Rhizophoraceae | <i>Bruguiera gymnorhiza</i> |
| 17 | DQ202709 | 1246 | 863 | 287 | Oleaceae | <i>Olea europaea</i> |

جدول ۳- بررسی هدف گیری پروتئین GAI و PIP گردو با استفاده از نرم افزار TargetP 1.1
Table 3- study of GAI and PIP2 protein targeting in walnut by TargetP 1.1 software

| Name | Len | cTP | mTP | SP | other | Loc | RC |
|--------------|-----|-------|-------|-------|-------|-----|----|
| Sequence GAI | 613 | 0.271 | 0.120 | 0.097 | 0.710 | - | 3 |
| Sequence PIP | 287 | 0.022 | 0.059 | 0.349 | 0.963 | - | 2 |

و استفاده از روش انتقال ژن برای دست یابی به ژنوتیپ‌های پاکوتاه در گردو آخرین راهکاری خواهد بود که می‌توان استفاده کرد.

همچنین در این همردیفی مشخص شد که گیاه *Medicago truncatula* از نظر ژن *GAI* از بقیه گیاهان هم خانواده دو لپه خود و تک لپه ها متفاوت است. از دیگر نتایج جالب این بررسی شباهت ژن *GAI* سیب اسپور تایپ^۳ با گیاهان تک لپه بود. ارقام اسپور تایپ سیب به دلیل رشد متراکم و کوتاهی بین گره‌ها و تعداد زیاد اسپور و کاهش تعداد شاخه‌های کم بار در مقایسه با ارقام دیگر از رشد کمتری برخوردارند و به این دلیل می‌توان آن‌ها را در تراکم بیشتر کشت نمود و سبب افزایش عملکرد در واحد سطح شد (۸). با بررسی توالی DNA و پروتئین ژن *GAI* در سه نوع سیب و همردیفی پروتئین‌های آن‌ها مشخص شد که در قسمت N ترمینال پروتئین *GAI* سیب‌های اسپورتایپ یک جهش اتفاق افتاده و همچنین بخشی از پروتئین حذف شده است، بنابر این یکی از دلایل رفتار رشدی متفاوت سیب‌های اسپور تایپ با دو گونه سیب دیگر را به تغییر در این ژن می‌توان نسبت داد (شکل ۴ و ۳). همان‌طور که در شکل نشان داده شده در سیب‌های اسپور تایپ در اثر جهش در دو اسید آمینه ۵۹L و ۵۸E، دومین *DELLA* به *DGCLA* تغییر یافته است همچنین دو حذف در ناحیه قبل از دومین *DELLA* یکی به اندازه ۱۲ اسید آمینه و دیگری ۸ اسید آمینه از ابتدای پروتئین *GAI* اتفاق افتاده است. علاوه بر آن دو حذف بزرگ بطول ۵۷ اسید آمینه در فاصله اسیدآمینه‌های ۱۳۶ تا ۱۹۳ و ۲۶ اسید آمینه در فاصله اسید آمینه ۲۳۴ تا ۲۷۳ در فاصله بین دومین *DELLA* و *GRAS* اتفاق افتاده که فاصله دو دومین را بیش از حد به هم نزدیک کرده است. احتمال می‌رود این جهش‌ها باعث تغییر میزان فعالیت پروتئین *GAI* و اختلال در مسیر پیام رسانی جیبرلین در سیب‌های اسپورتایپ شده است (شکل ۴).

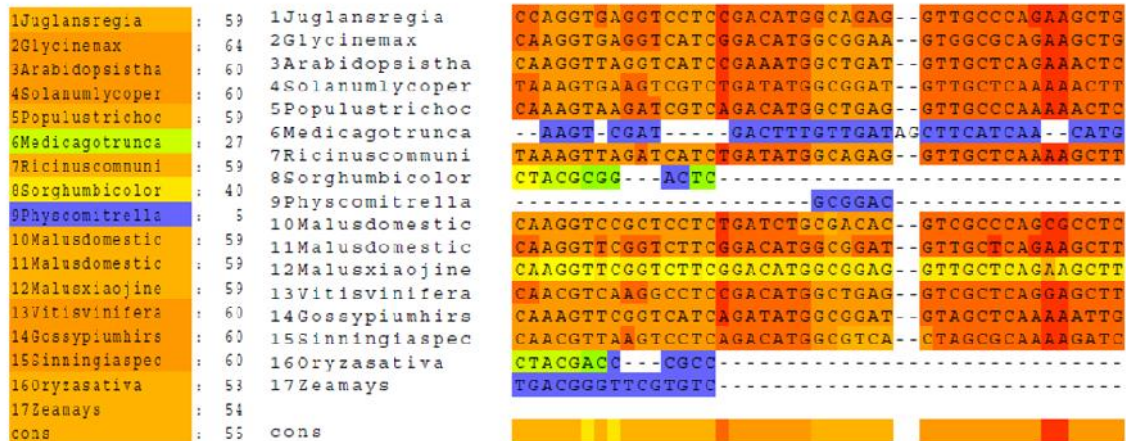
حذف الگو یا موتیف^۴ *DELLA* در N- ترمینال پروتئین‌های *DELLA* آرابیدوپسیس آن را به یک مهارکننده غیرحساس به *GA* و مهارکننده فعال مسیریگنال *GA* تبدیل می‌کند (۵). در دسترس بودن توالی ژنوم گیاه اجازه می‌دهد تا تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای و تکاملی در طول ژنوم به صورت منظم از خانواده ژن به عمل آید.

در خوشه (۱) گیاهان دو لپه چوبی شامل (*Malus x Vitis*، *Juglans regia*، *Populus trichocarpa domestica*، *Ricinus*، *Glycine max*) و گیاهان دو لپه علفی شامل (*Solanum lycopersicum*، *Gossypium hirsutum*، *communis*، *Arabidopsis thaliana*، *Sinningia speciosa*، در خوشه دوم گیاهان تک لپه شامل *Sorghum bicolor*، *Zea mays*، *Oryza sativa* و گیاه *Malus baccata var. xiaojinensis* از دو لپه‌ها قرار گرفتند. در گروه سه، گونه *Medicago truncatula* و در گروه چهار گونه *Physcomitrella patens* که یک گونه خزّه از بریوفیت‌ها است و به عنوان یک گیاه مدل در تحقیقات تکاملی استفاد می‌شود قرار گرفتند. در جدول ماتریس عدم تشابه مربوط به ژن *GAI* کمترین ضریب عدم تشابه مربوط به *Malus baccata var. xiaojinensis* و *Malus x domestica* با ۰/۰۶۵ شبیه‌ترین گونه‌ها بودند و بیشترین ضریب عدم تشابه مربوط به دو گونه *Physcomitrella patens* و *Medicago truncatula* با ضریب ۲/۲۳۶ دورترین گونه‌ها از هم بودند. همان‌طور که انتظار می‌رفت گیاه گردو (۱) در گروه گیاهان دو لپه چوبی قرار گرفت و با گیاهانی مثل سیب، انگور و صنوبر هم گروه بود.

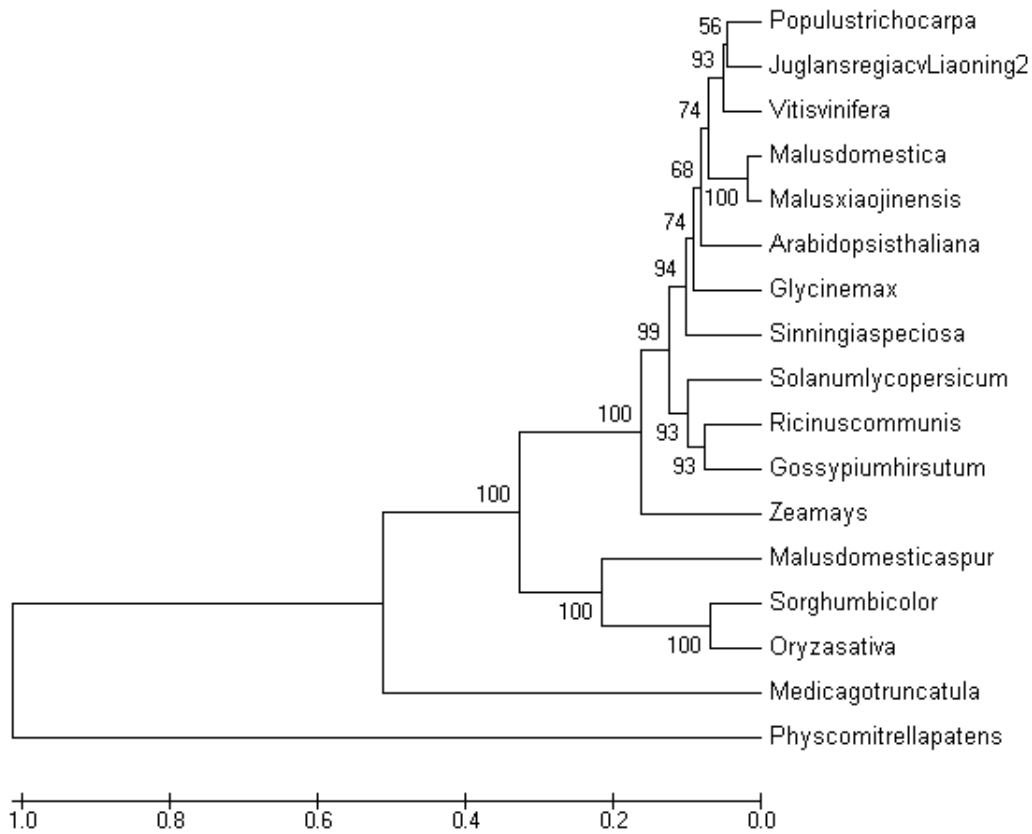
توالی ژن *GAI* گیاه گردو مربوط به رقم 2 Liaoning بود که یک رقم با باردهی جانبی با منشأ شمال شرق چین است و با توجه به توالی مورد بررسی و مقایسه آن با سایر گونه‌ها، جهش مشخصی در دامین‌های شناخته شده آن دیده نشد، البته برای بررسی مقایسه‌ای و دقیق تر و برای ارتباط دادن برخی صفات مربوط به عادت رشد، نحوه گلدی و میوه دهی رقم 2 Liaoning به عملکرد این ژن، به توالی- های ارقام با باردهی خوشه‌ای^۱ و انتهای^۲ و همچنین گونه‌های دیگر گردو نیاز است که در حال حاضر این اطلاعات در بانک ژن موجود نیست. بنابرین با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق ژنوتیپ های موجود گردو فاقد آلل *GAI* ژن پاکوتاهی هستند لذا برای بدست آوردن گیاهان با رشد محدود و پا کوتاه در گردو نیاز به همسانه سازی و توالی یابی ژنوتیپ‌های پاکوتاه گردو های ایرانی و مقایسه ویژگی‌های آن در سطح توالی DNA و پروتئین هستیم. اگر در ژنوتیپ‌های داخلی انتخاب شده نیز در سطح توالیهای DNA و پروتئین اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، ایجاد جهش‌های هدف مند

3- Spur type
4- Motif

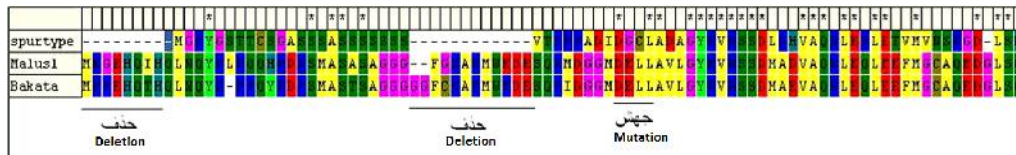
1- Cluster Bearing
2-Terminal



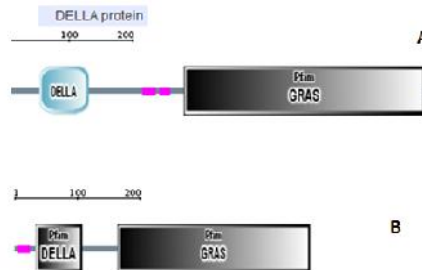
شکل ۱ - هم‌ردیفی چندگانه ژن GAI با استفاده از نرم افزار Tcoffee
Figure 1- Multiple alignment of GAI gene by Tcoffee software



شکل ۲_درخت فیلوژنتیکی ژن GAI با استفاده از روش کلاستر بندی UPGMA
Figure 2- Phylogenetic tree of GAI gene by UPGMA method



شکل ۳- بخشی از هم‌ردیفی توالی پروتئین GAI در سه گونه سیب و مشخص کردن نقاط جهش و حذف
Figure 3- A part of GAI protein alignment in three apple species and mutation, deletion point



شکل ۴- تغییرات دامین‌های DELLA در پروتئین GAI دو گونه سیب *Malus xiaojinensis* (بالا) و *Malus domestica spur type* (پایین) یک حذف در ناحیه بین دو دامین مشاهده می‌شود.

Figure 4- DELLA domain modification of GAI protein in *Malus xiaojinensis* apple (A) and *Malus domestica spur type* (B) a deletion occur between two domains

اتصال به GA را بر عهده دارد. دامین دوم B با نام DELLA در موقعیت (۱۱۷-۴۵) قرار داشت و جزو خانواده تنظیم‌کننده‌های رونویسی است (شکل ۷). دامین A در پروسه‌های مختلفی از جمله فرایند خواب بذر، فرایند جوانه‌زنی بذر، فرایند پاسخ به محرک‌های جیبرلین، فرایند بیوسنتز الیگوساکاریدهای خانواده رافینوز، مسیرهای پیام‌رسانی^۳ اسید جیبرلیک، تنظیم مثبت مسیر پیام‌رسانی با واسطه GA، فرایند پاسخ به نورمادون قرمز، مسیر پیام‌رسانی اسید جاسمونیک و فرایند توسعه اندام‌های چند سلولی دخالت دارد. در آرابیدوپسیس ثابت شده است که جهش در موقعیت (۴۴-۲۸) به طول ۱۷ اسید آمینه باعث ایجاد فنوتیپ پاکوتاهی می‌شود. همچنین در انگور مشخص شده که تغییر اسید آمینه L به H در دامین DELLA باعث ایجاد پاکوتاهی می‌شود (۵).

در بررسی هم‌ردیفی ژن *PIP2* مشخص شد که این ژن نیز به دو گروه تک‌په‌ها شامل (*Triticum aestivum* *Zea mays*) و دو په‌ها تقسیم می‌شود (شکل ۶). گیاهان دو په خود به دو زیر خانواده گیاهان چوبی که شامل *Vitis* *Olea Juglans regia Malus prunifolia avinifera Arabidopsis Phaseolus vulgaris* و گیاهان علفی *europaea Medicago Glycine max Brassica napus thaliana caryophyllus Dianthus Solanum tuberosum truncatula Bruguiera* و دو گونه جنگلی *Hevea brasiliensis* و *gymnorhiza* تقسیم می‌شوند. نتایج نشان داد که در جدول ماتریس

نقش پروتئین GRAS در انتقال پیام^۱ و نمو در گیاهان و مکانیسم رشد تنظیمی DELLA- GA مورد مطالعه قرار گرفته است و مضاعف شدگی^۲ ژن، دلیل اصلی برای گسترش خانواده DELLA عنوان شده است (۴). فشار انتخابی پس از مضاعف شدگی ژن در DELLAs منجر به شکل‌گیری گروه‌های متفاوت DELLA شده است. طول توالی پروتئین GAI در گیاهان مختلف بسیار متغییر و از ۶۳۶ اسید آمینه در سیب *Malus baccata var. xiaojinensis* تا ۳۳۶ اسید آمینه در گونه‌ای بریوفیت به نام *Physcomitrella patens* متفاوت بود. طول پروتئین GAI در گردو ۶۱۳ اسید آمینه بود. بررسی ساختار دوم پروتئین GAI گردو با استفاده از PSIPRED نشان داد که این پروتئین حاوی ۹ رشته و ۱۵ مارپیچ است. موتیف‌های موجود و موقعیت آن‌ها در این پروتئین عبارتند از: (۴۵-۴۹) DELLA، (۶۷-۷۱) LEXLE، (۹۰-۹۴) VHYNP، (۳۴۶-۳۵۰) LXXLL، VHVID (۴۴۶-۴۵۰) موقعیت هلیکس‌ها به ترتیب در موقعیت (۴۳-۵۱)، (۶۰-۷۴)، (۹۹-۱۰۴)، (۲۴۵-۲۵۹) و (۲۶۰-۲۷۳) و (۲۸۳-۲۹۸) و (۳۱۰-۳۲۱) و (۳۲۳-۳۴۰) و (۳۵۹-۳۶۷) و (۳۸۸-۴۰۵) و (۴۵۵-۴۶۵) و (۴۸۵-۵۰۱) و (۵۱۰-۵۲۷) و (۵۱۰-۵۵۰) و (۵۴۱) و (۵۶۰-۵۷۲) و صفحات بتا در موقعیت‌های (۳۴۶-۳۵۰) و (۳۷۵-۳۸۱) و (۴۱۰-۴۱۷) و (۴۳۷-۴۴۱) و (۴۷۰-۴۷۶) قرار داشت (شکل ۸). دامین اول A با نام GRAS در موقعیت (۲۴۵-۶۰۴) قرار دارد که از نظر عملکرد، فعالیت هیدرولازی، اتصال به پروتئین و

- 1- Signal transduction
- 2- Duplication

عدم تشابه مربوط به گونه‌های *Hordeum vulgare* و *Medicago truncatula* با ۰/۴۹ بود.

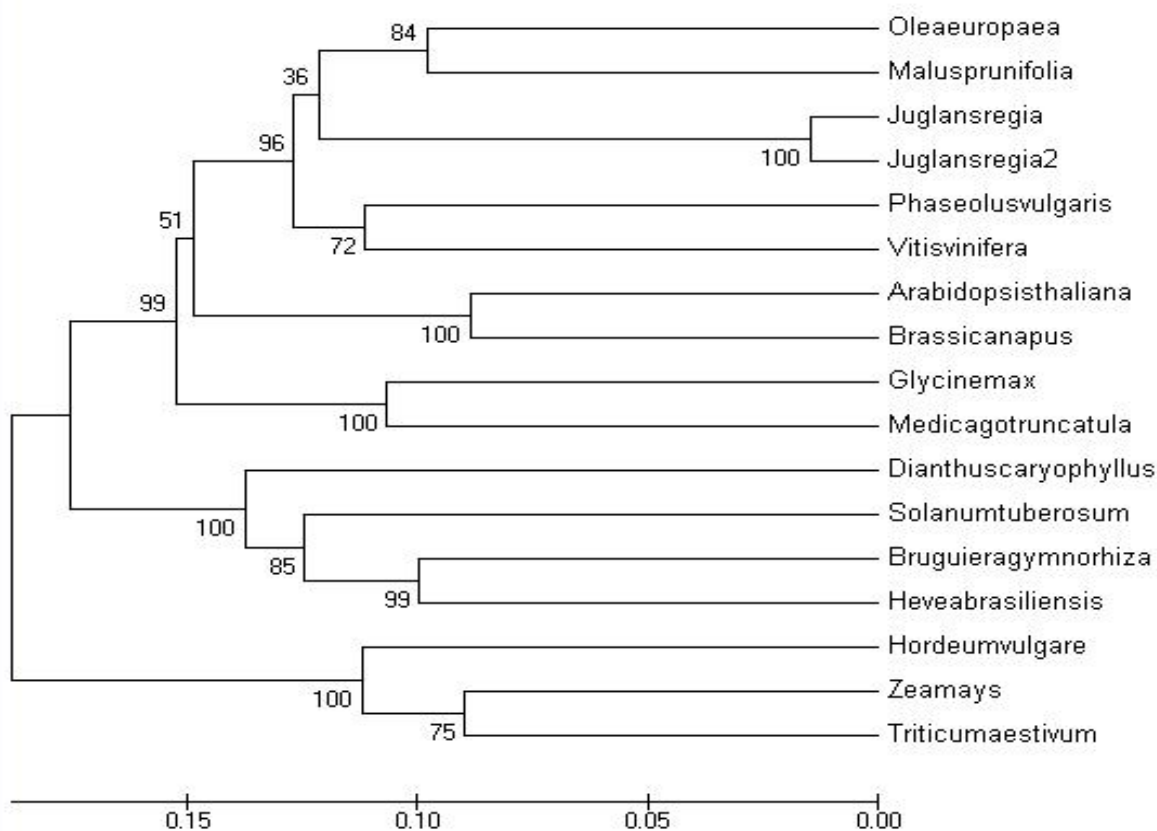
عدم تشابه مربوط به ژن *PIP2* کمترین ضریب عدم تشابه مربوط به *Juglans regia 1* و *Juglans regia 2* با ۰/۰۳ و بیشترین ضریب

| | | | |
|------------------|------|------------------|--|
| Oleaeuropaea | : 31 | Oleaeuropaea | CCTGAGGAGGTCGGTGGTTTACAGAGGCTTATTCGTCAGTTGG |
| Dianthuscaryoph | : 36 | Dianthuscaryoph | GCTGAACAATGGTCAATCTACAGAGGACTAATTCAGAGTTTCAT |
| Malusprunifolia | : 37 | Malusprunifolia | GCTCACCIAAGTGGTGGTTTACAGAGGCTGTCTATTGGCTGAGTTGGT |
| Juglansregia | : 81 | Juglansregia | TTTCACTCAGTGGTGGTTTACAGAGGCTATCATTCGGGAGTTGAG |
| Juglansregia2 | : 31 | Juglansregia2 | TTTCACTCAGTGGTGGTTTACAGAGGCTATCATTCGGGAGTTGAG |
| Phaseolusvulgar | : 80 | Phaseolusvulgar | GCTAACAAAGTGGTGGTTTACAGAGGCTGTCTATTGGCTGAGTTGAT |
| Bruguietragymnor | : 91 | Bruguietragymnor | GCTAACGCTGTGGTGGTTTACAGAGGCTGTCTATACAGGAGTTGAT |
| Heveabrasiliens | : 86 | Heveabrasiliens | GATCAAGCTCTGGTGGTTTACAGGCTGTCTATAGCTGAGTTGAT |
| Vitisvinifera | : 31 | Vitisvinifera | GCTCACTAAGTGGTGGTTTACAGAGGCTGTCTATTGGGGAHTTAT |
| Arabidopsisthal | : 37 | Arabidopsisthal | GCTAAAGAAAGTGGTGGTTTACAGAGGCTGTCTATAGGAGTTGGT |
| Brassiccanapus | : 85 | Brassiccanapus | GCTCAAGAAAGTGGTGGTTTACAGAGGCTGTCTATAGGAGTTGGT |
| Zeamays | : 82 | Zeamays | GCTGGGGTCTGGTGGTTTACAGAGGCTGTCTATAGGAGTTGGT |
| Glycinemax | : 98 | Glycinemax | GCTCAAAAGTGGTGGTTTACAGAGGCGCCATAGGCTGAGTTGAG |
| Medicagotruncat | : 87 | Medicagotruncat | TTTAAACAAGTGGTGGTTTACAGAGGCTGTCTATAGCTGAGTTGAT |
| Hordeumvulgare | : 87 | Hordeumvulgare | GCTCCGGATGGTGGTGGTTTACAGAGGCTGTCTATAGGAGTTGGT |
| Triticumaestivu | : 79 | Triticumaestivu | GCTGACCAAGTGGTGGTGGTTTACAGAGGCTGTCTATAGGAGTTGGT |
| Solanumtuberosu | : 83 | Solanumtuberosu | GCTTACCAAGTGGTGGTTTACAGAGGCTGTCTATAGCTGAATTCAG |
| cons | : 34 | cons | |

شکل ۵ - بخشی از هم‌ردیفی توالی ژن *PIP2* با استفاده از برنامه Tcoffee،

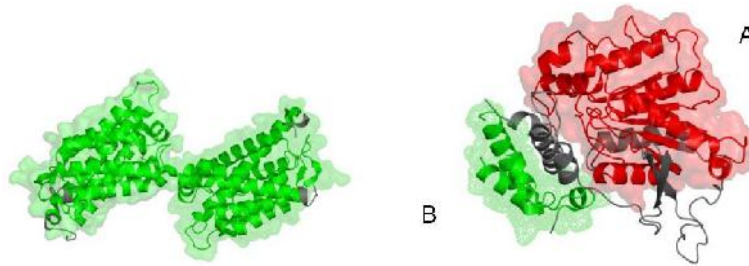
ستاره‌های موجود در زیر ستون‌ها نشان دهنده نقاط حفاظت شده (conserved) در روی توالی است

Figure 5- Multiple alignment of *PIP2* gene by Tcoffee software
Stars under columns indicate conserved sequence



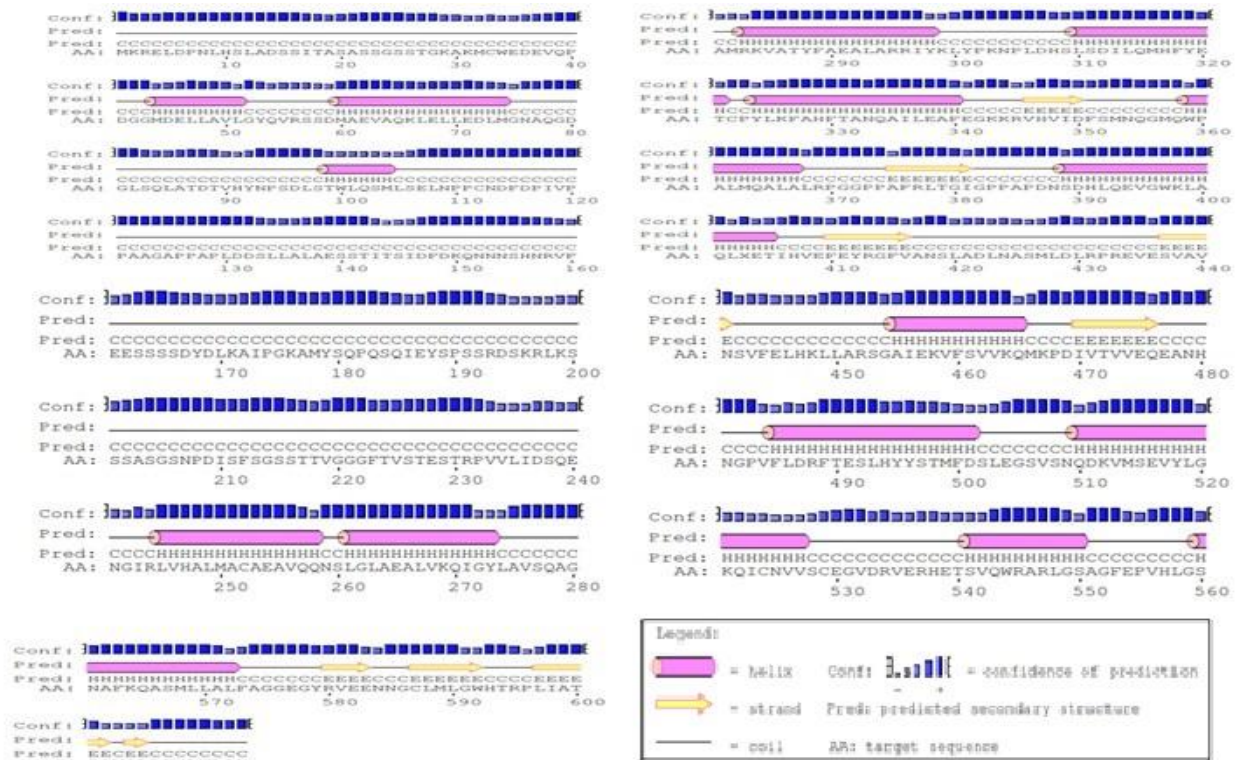
شکل ۶ - درخت فیلوژنتیکی ژن *PIP2* مربوط به گونه‌های مورد بررسی با استفاده از UPGMA

Figure 6- Phylogenetic tree of *PIP2* gene by UPGMA method



شکل ۷- سمت راست: شکل فضایی پروتئین GAI ، زنجیره A دامین GRAS و زنجیره B حاوی دامین DELLA سمت چپ: شکل فضایی پروتئین PIP2

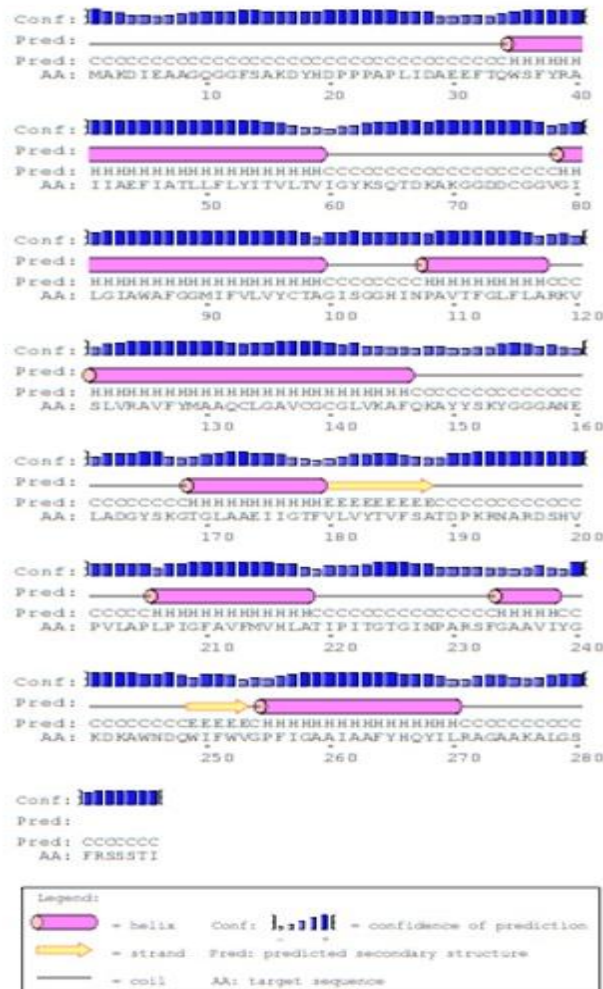
Figure 7-(Right): 3D structure of GAI protein, A chain is GRAS domain and B chain include DELLA domain, (left) 3D structure of PIP2 protein



شکل ۸- آنالیز ساختار دوبعدی پروتئین GAI گردو با نرم افزار PSIPRED
Figure 8- 2D structure of GAI protein in walnut by PSIPRED software

ویرایش^۱ دارد. با توجه به نبود اطلاعات از توالی ژنومی ژن *PIP2* در گردو برای پی بردن به تعداد اینترون و اگزون در گردو از گونه انگور (*Vitis vinifera*) که توالی ژنومی آن توالی‌یابی شده است استفاده شد همچنین نتایج آنالیز در گونه‌های دیگر نشان داد که در تمام گونه‌های مورد بررسی این تعداد اگزون و اینترون ثابت بوده ولی طول آن‌ها متفاوت است بطوریکه در انگور که نتایج آن در جدول ۴ آورده شده به ترتیب ۲۹۲ و ۲۹۶ و ۱۴۱ و ۱۱۴ نوکلئوتید بود (جدول ۴).

هم‌ردیفی‌های چندگانه و بررسی توالی‌های mRNA این ژن‌ها در گیاهان فوق نشان داد که بین این ژن‌ها به رغم تفاوت در طول شباهت بسیار زیادی خصوصاً در نواحی حفاظت شده وجود دارد. با این وجود علت اصلی تفاوت در عملکرد این ژن‌ها به جهش‌هایی در مناطق غیرحفاظت شده نسبت داده می‌شود. علاوه بر آن مشخص شد که گیاه یونجه هم از نظر توالی ژن *GAI* و هم از نظر توالی ژن *PIP2* با گیاهان دیگر اختلاف زیادی دارد. mRNA ژن *PIP2* در اکثر گونه‌هایی که توالی ژنوم آن‌ها مشخص شده است دارای ۴ اگزون و ۳ اینترون بود که پس از رونویسی احتیاج به یک مرحله



شکل ۹- آنالیز ساختار دوبعدی پروتئین PIP2 گردو با نرم افزار PSIPRED
Figure 9- 2D structure of PIP2 protein in walnut by PSIPRED software

آمینوهای هدف در فسفوریلاسیون^۱ در یوکاریوت ها عمدتاً سرین^۲، ترئونین^۳ یا تیروزین^۴ هستند و در پروکاریوت ها اسید آسپارتیک^۵ یا هیستیدین^۶ هستند. همچنین این پروتئین ها بوسیله RNAI به پروتئین یوبیکوتین^۷ متصل شده و به پروتئوزوم^۸ برای تخریب هدایت می شوند.

طول توالی پروتئینی PIP2 در گیاهان مختلف بر خلاف ژن *GAI* تفاوت زیادی نداشت و خیلی به هم نزدیک بودند. طول آن ها از ۲۵۷ اسید آمینه در *Triticum aestivum* تا ۲۹۰ اسید آمینه در *Zea mays* متغییر بود، به طوری که در گردو ۲۸۷ اسید آمینه طول داشت. نتایج نشان داد تنوع طول پروتئین در تک لپه ها بیشتر از دولپه ها بود. توالی پروتئینی شباهت زیادی به خانواده آکوپورین های MIP داشت. آکوپورین ها دارای دو جفت دامین تکراری که هر کدام دارای ۳ دامین گذرنده از غشاء و یک لوپ تشکیل دهنده حفره هستند و همچنین دارای موتیف Asn-Pro-Ala می باشند. تغییرات پس از ترجمه ای که روی آن انجام می شود، شامل فسفوریلاسیون در Ser280 و Ser283 است که بوسیله تیمار نمک و پراکسید هیدروژن تغییر می کند. اسید

- 1-Phosphorylation
- 2- Serine
- 3- Threonine
- 4- Tyrosine
- 5- Aspartic acid
- 6- Histidine
- 7- Ubiquitin
- 8- Proteasome

جدول ۴- آنالیز توالی ژن GAI و PIP2 انگور برای پیش بینی اگزون‌ها در گردو با استفاده از نرم افزار GENESCAN

Table 4- PIP2 and GAI gene sequence analysis in vitis for prediction of exons in walnut by GENESCAN software

| Gene | Gn.Ex | Type | S | Begin | End | Len | Fr | Ph | I/Ac | Do/T | CodRg | P | Tscr |
|-----------------------------------|-------|------|---|-------|------|------|----|----|------|------|-------|-------|--------|
| GAI (<i>Vitis vinifera</i>) | 1.01 | Sngl | - | 2167 | 395 | 1773 | 1 | 0 | 63 | 47 | 1406 | 0.687 | 134.25 |
| PIP2 (<i>Vitis vinifera</i>) | 1.01 | init | + | 142 | 433 | 292 | 0 | 1 | 31 | 65 | 439 | 0.987 | 38.21 |
| | 1.02 | init | + | 573 | 868 | 296 | 1 | 2 | 24 | 31 | 306 | 0.938 | 20.23 |
| | 1.03 | init | + | 965 | 1105 | 141 | 1 | 0 | 5 | 50 | 177 | 0.786 | 11015 |
| | 1.04 | term | + | 1199 | 1312 | 114 | 1 | 0 | 45 | 39 | 69 | 0.642 | 1027 |

Gn.Ex : gene number, exon number

Type: Sngl = Single-exon gene

Init = Initial exon

Intr = Internal exon

Term = Terminal exon

S: DNA strand (+ = input strand; - = opposite strand)

Begin : beginning of exon or signal

End: end point of exon or signal

Len : length of exon or signal (bp)

Fr: reading frame

Ph: net phase of exon (length mod 3)

I/Ac: initiation signal or acceptor splice site score (x 10)

Do/T: donor splice site or termination signal score (x 10)

CodRg: coding region score (x 10)

P: probability of exon (sum over all parses containing exon)

Tscr: exon score (depends on length, I/Ac, Do/T and CodRg scores)

پایین آکوپورین‌ها در هلو پیدا شده است. تبدیل اسید آمینه K به A در موقعیت اسید آمینه ۳ پروتئین باعث کاهش فولدینگ و فعالیت انتقال آب می‌شود. در آرابیدوپسیس ۳۵ ژن و در ذرت ۳۶ ژن مربوط به آکوپورین‌ها شناسایی شده است، که هر کدام در موقعیت خاصی در داخل سلول فعالیت می‌کنند. آنالیز بیوانفورماتیکی نشان می‌دهد که پروتئین‌های خانواده MIP شامل شش قطعه گذرنده از غشاء آلفا هلیکس هستند که احتمالاً، از رویدادهای تکراری پشت سر هم داخل ژنی پروتئین اجدادی که شامل سه قطعه گذرنده از غشاء بودند به وجود آمده است (۱۵). بررسی ساختار دوم پروتئین PIP2 گردو با استفاده از PSIPRED نشان داد که این پروتئین حاوی ۲ رشته ۸ و ۸ مارپیچ می‌باشد. هلیکس‌ها در موقعیت‌های (۳۵-۵۹) (۳۵-۹۹) (۱۱۷-۱۰۸) (۱۴۶-۱۲۱) (۱۷۹-۱۶۸) (۲۱۸-۲۰۶) (۲۳۸-۲۳۴) (۲۷۰-۲۵۶) و صفحات بتا در موقعیت‌های (۱۸۸-۱۸۰) و (۲۵۳-۲۴۸) قرار داشتند (شکل ۹).

در مقایسه ساختار سه بعدی پروتئین GAI گردو در بانک PDB مشابه ترین ساختار مربوط به زیرواحد بتای پروتئین GAI آرابیدوپسیس دست آمد. پروتئین GAI گردو درصد یکسانی (Identity) ۴۶٪ در ناحیه دامین DELLA با e-value برابر با 1e-27 با این پروتئین داشت. همچنین با مقایسه ساختار سه بعدی پروتئین PIP2 گردو، مشابه ترین پروتئین، زنجیره A پروتئین

اسید آمینه‌های لیزین^۱ و گلوتامیک اسید^۲ Lys3 و Glu6 در این پروتئین، معمولاً به ترتیب دو یا یک متیل می‌گیرند و متیله می‌شوند. پروتئین PIP2 در آرابیدوپسیس به طور عمده در ریشه‌ها و کپسول‌های سبز بذر بیان می‌شود، ولی در سطح کمتری در اندام‌های هوایی و در جوانه‌های گل هم بیان می‌شود. در داخل سلول در پلاسمودسماتا، واکوئل و بطور عمده در غشای پلاسمایی دیده می‌شوند. عملکرد بیولوژیک این پروتئین شامل انتقال بین غشایی پراسید هیدروژن، پاسخ به محرک‌های اسید آبسزیک^۳ و پاسخ به کمبود آب است. محل قرار گیری پروتئین PIP2 با استفاده از نرم افزار Target P این موضوع را تأیید کرد و مشخص شد که در هیچ یک از اندام‌های داخل سلولی مانند میتوکندری، کلروپلاست، هسته قرار ندارد و همچنین یک پروتئین ترشحی نیز نیست (جدول ۳).

خاموش کردن ژن آکوپورین‌های گیاهان به رشد ضعیف گیاه و حتی مرگ گیاه مرتبط شده است. آکوپورین‌ها با انتقال آب بین سلول‌های پارانشیم چوبی و لوله‌های مسدود شده در گردو ارتباط دارند (۱۴). آکوپورین‌ها با نحوه رشد پاکوتاه در زیتون مرتبط هستند (۱۱). همچنین ارتباط کاملاً واضح و روشنی بین پایه‌های پاکوتاه و بیان

- 1- Lysine
- 2- Glutamic acid
- 3- Abscisic Acid

تحلیل قرار گرفت و ساختار دو بعدی و موقعیت هلیکس‌ها و صفحات مشخص شد. همچنین از روی مشابه‌ترین گونه در بین گیاهان باغی به گردو که تاکنون توالی ژنوم آن توالی یابی شده است یعنی انگور، آگزون و اینترون آن پیش بینی شد که نزدیک‌ترین پیش‌بینی به حالت واقعی است. در این کار ما مجموعه ای از آنالیزهای بیوانفورماتیکی را برای این ژن‌های کلیدی در گیاهان برای توضیح ارتباط ساختاری، عملکردی و فیلوژنتیکی بکار گرفتیم.

اسفناج (*Spinacia oleracea*) بدست آمد. درصد یکسانی (Identity) برابر ۷۶ درصد و $2e-154 = evalue$ بود. همچنین همردیفی تمام توالی‌ها، نواحی خیلی حفاظت شده را نشان داد که می‌تواند برای طراحی پرایمر برای واکنش PCR به منظور جداسازی خانواده ژن‌های PIP و GAI، همسانه‌سازی، مشخص کردن توالی این ژن‌ها در گیاهان، مطالعه تنوع ژنتیکی بکار رود. در تحقیق حاضر برای اولین بار این ژن‌ها در گردو مورد تجزیه و

منابع

1. Achard P., Cheng H., De Grauwe L., Decat J., Schoutteten H., Moritz T., Van Der Straeten D., Peng J., and Harberd N.P. 2006. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 311: 91-94.
2. Achard P., Liao L., Jiang C., Desnos T., Bartlett J., Fu X., Harberd N.P. 2007. DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiology* 143: 1163-1172.
3. Bolle C. 2004. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* 218: 683-692.
4. Boss P.K., Thomas M.R. 2002. Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature* 416:847-850.
5. Cao, D., Hussain, A., Cheng, H., and Peng, J. 2005. Loss of function of four DELLA genes leads to light-and gibberellin-independent seed germination in *Arabidopsis*. *Planta*, 223: 105-113.
6. Darabi, M., Masoudi-Nejad, A., and Nemat-Zadeh, G. 2012. Bioinformatics study of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGR) gene in Gramineae. *Molecular biology reports*, 39: 8925-8935.
7. Fleet C.M., and Sun T.P. 2005. A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 77-85.
8. Hasani G., Baneh H.D., Mahmudzadeh H. 2012. Fruit Yield Efficiency and Some Vegetative Characteristics of Commercial and Spur Type Apple Cultivars. *Seed and Plant Production Journal* 28:373-376. (in Persian with English abstract)
9. Lovisolo C., Secchia F., Nardinib A., Salleob S., Buffac R., and Schubert A. 2007. Expression of PIP1 and PIP2 aquaporins is enhanced in olive dwarf genotypes and is related to root and leaf hydraulic conductance. *Physiologia Plantarum* 130: 543-551.
10. Mansouri S., Mehrabi A.A., Kahrizi D. 2013. Phylogenetic Analysis of SOS1 Gene in Different Species Based on Coding Sequences. *Middle-East Journal of Scientific Research*.14:1226-9.
11. Nardini A., Gasco A., Raimondo F., Gortan E., Lo Gullo MA., Caruso T., and Salleo S 2006. Is rootstock-induced dwarfing in olive an effect of reduced plant hydraulic efficiency?. *Tree Physiology* 26:1137-1144.
12. Olszewski N., Sun T.P., Gubler F. 2002. Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell*. 14:S61-S80.
13. Sakr S., Alves G., Morillon R., Maurel K., Decourteix M., Guillot A., Lessard P.F., Julien J.L., and Chrispeels M.J. 2003. Plasma membrane aquaporins are involved in winter embolism recovery in walnut tree. *Plant Physiology*, 133: 630-641.
14. Weibel A.M. 2008. Dwarfing mechanisms of *Prunus* species as interstems and rootstocks on peach [*Prunus persica* (L.) batsch] tree vegetative growth and physiology. Dissertation, Graduate School of Clemson University, USA
15. Yamaguchi S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology* 59:225-251.