

مطالعه *in silico* خانواده ژنی شبه استریکتوسیدین سینتاز (*SSL*) در برنج (*Oryza sativa*)

امین عابدی^۱، رضا شیرزادیان خرم‌آباد^{۲*}، محمدمهدی سوهانی^۳

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی-گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲. استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳. دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۱۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۲/۱۸)

In silico study of strictosidine synthase like (*SSL*) gene family in rice (*Oriza sativa*)

Amin Abedi¹, Reza Shirzadian-Khoramabad^{2*}, Mohammad Mehdi Sohani³

1. Ph.D student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

2. Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

3. Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: Dec. 2, 2016 - Accepted: Mar. 9, 2017)

Abstract

Strictosidine synthase is a key enzyme in the monoterpene indole alkaloids biosynthesis pathway. Proteins with Str_synth domain have been identified in plants, bacteria, insects and even mammals and called Strictosidine synthase-like due to unknown functional roles. With the *Arabidopsis* and rice genome sequence completed, *SSL* genes were also identified in these plants. However, little is known about evolutionary path, gene structure, expansion and function of *SSL* family in rice. In this study, through bioinformatic analysis, a total of 23 *SSL* genes were identified in rice genome. A phylogenetic analysis of the *SSL* genes in rice and *Arabidopsis* clarified that these genes could be divided into four different groups and the evolutionary paths are different in rice and *Arabidopsis*. The *OsSSL* genes contained zero to five introns and were distributed across 10 out of 12 chromosomes at different densities and tandem duplication was a major cause in expanding this family. Promoter analysis showed the presence of several cis-regulatory elements related to stress and hormone response in regulatory region, indicating probable their role in stress response. Microarray-based expression analysis of *OsSSL* genes indicated that a few number of these genes were widely expressed in various tissues and also in response to some abiotic stresses. This study is the first report about *SSL* gene family in rice and provides a framework for further analysis of the biological functions of *SSL* genes in either rice or other crops.

Keywords: Expression Analysis, Gene Family, *in silico* Study, Phylogenetic Analysis.

چکیده

استریکتوسیدین سینتاز آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتزی ایندول آلکالوئیدهای مونوترپنوئیدی است. پروتئین‌های داری دمین Str_synth در گیاهان، باکتری‌ها، حشرات و پستانداران شناسایی شده‌اند و به علت نامشخص بودن نقش کارکردی آنها شبه استریکتوسیدین سینتاز نامیده می‌شوند. با تکمیل پروژه توالی یابی ژنوم آراییدوپسیس و برنج، ژن‌های شبه استریکتوسیدین سینتاز در این گیاهان نیز شناسایی شد. با این حال اطلاعات کافی در مورد ساختار ژن، تاریخچه تکاملی، نحوه گسترش و نقش کارکردی خانواده ژنی *SSL* برنج وجود ندارد. در این مطالعه بر اساس آنالیزهای بیوانفورماتیکی ۲۳ ژن *SSL* در ژنوم برنج شناسایی شد. آنالیز فیلوژنتیکی پروتئین‌های *SSL* برنج و آراییدوپسیس مشخص کرد که این ژن‌ها در چهار گروه قرار می‌گیرند و مسیر تکاملی این خانواده در برنج و آراییدوپسیس متفاوت است. ژن‌های *OsSSL* دارای صفر تا پنج اینترون بوده و در ۱۰ کروموزوم از ۱۲ کروموزوم برنج با تراکم متفاوت قرار داشته و مضاعف‌شدگی پشت سر هم عامل اصلی گسترش این خانواده ژنی است. آنالیز پیش‌ر نشان داد که چندین عنصر تنظیمی *cis* پاسخ به تنش‌ها و هورمون‌ها در ناحیه تنظیمی وجود دارد که نشان دهنده نقش این ژن‌ها در پاسخ به تنش‌ها می‌باشد. آنالیز بیان ژن‌های *OsSSL* بر اساس داده‌های ریزآرایه نشان داد که تعداد اندکی از این ژن‌ها در بافت‌ها و نیز تنش‌های غیر زیستی بیان بالایی دارند. این مطالعه اولین گزارش در مورد خانواده ژنی *SSL* در برنج بوده و می‌تواند یک چهارچوب برای بررسی کارکردهای بیولوژیکی ژن‌های *SSL* در برنج و گیاهان دیگر فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آنالیز بیان، آنالیز فیلوژنتیکی، خانواده ژنی، مضاعف‌شدگی، مطالعات *In Silico*

مقدمه

آلکالوئیدها گروه وسیع و متنوعی از ترکیبات طبیعی هستند که در بیست درصد گونه‌های گیاهی یافت می‌شوند. بیش از دوازده هزار محصول آلکالوئیدی شناسایی شده که بسیاری از آنها دارای خواص درمانی می‌باشند (Facchini *et al.*, 2004). ایندول آلکالوئیدهای مونوترپنوئیدی (MIA) گروه خاصی از آلکالوئیدهای گیاهی هستند که از نظر درمانی مورد توجه قرار گرفته‌اند. این ترکیبات پیچیده طبیعی دارای تنوع گسترده‌ای از نظر ساختاری و فعالیت‌های بیولوژیک می‌باشند. وین‌بلاستین^۲، وین‌کریستین^۳ و کامپتوتسین^۴ دارای خاصیت ضد سرطانی و کوئینون^۵ دارای خاصیت ضد مالاریا می‌باشد (OConner and Maresh, 2006).

مسیر بیوسنتز MIA یکی از مهمترین مسیرهای متابولیکی در گیاهان بوده که بیش از ۳۰۰۰ ترکیب آلکالوئیدی مختلف را در گیاهان خانواده‌های *Apocynaceae*, *Alangiaceae*, *Nyssaceae*, *Rubiaceae*, *Loganiaceae* و *Icacinaceae* تولید می‌کند (Brown *et al.*, 2014). استریکتوسیدین سینتاز^۶ (STR) (EC 4.3.3.2) آنزیم کلیدی این مسیر بوده و از طریق کاتالیز واکنش تریپتامین^۷ و سکولوگانین^۸ موجب تولید استریکتوسیدین^۹ می‌شود (Stockigt *et al.*, 2008). STR متعلق به گروه آنزیم‌های Nucleophilic attack six-bladed β -propeller (N6P) می‌باشد. این آنزیم‌ها دارای ویژگی کاتالیتیکی مشترک حمله نوکلئوفیلی به یک سوبسترای الکتروفیل هستند.

آنزیم STR اولین بار از گیاه پرپوش (*Catharanthus roseus*) جداسازی شد. این گیاه توانایی تولید بیش از ۱۳۰ نوع MIA را دارد (Fabbri *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2000). ژن STR گیاه پرپوش مورد مطالعه قرار گرفته و نشان داده شده که بیان این ژن با تنش القاء می‌شود (Memelink *et al.*, 2007). الیستورهای قارچی، نور ماوراء بنفش و متیل جاسمونات باعث افزایش بیان ژن STR در پرپوش می‌شوند (Menke *et al.*, 1992; Pasquali *et al.*, 1999). بیان ژن STR در اثر سرما، شوری و NO تحت تاثیر آبشار کینازی و مسیر پیام‌رسانی کلسیم القاء می‌شود (Dutta *et al.*, 2013).

پروتئین‌های همولوگ ژن STR که دارای دمین Str_synth (دمین کارکردی آنزیم‌های استریکتوسیدین سینتاز) هستند در گیاهان، باکتری‌ها، حشرات و حتی پستانداران دیده می‌شود. بعنوان مثال پروتئین همومیوسین یک پذیرنده لکتین بوده و در سیستم ایمنی مگس سرکه نقش دارد (Theopold *et al.*, 1996). همسانه‌سازی ژن همومیوسین و بررسی مولکولی آن مشخص کرد که این پروتئین یک گلیکوپروتئین متصل به غشاء بوده و دارای یک ناحیه کوتاه درون سلولی و دو ناحیه خارج سلولی است که شامل یک دمین مشابه با پروتئین‌های STR گیاهی و یک دمین مشابه به میوسین در انسان می‌باشد. همچنین یک پروتئین محلول در مگس سرکه شناسایی شد که تنها دارای دمین Str_synth بوده و ناحیه بین‌غشایی و شبه میوسین را از دست داده است (Fabbri *et al.*, 2000). اگرچه آرآبیدوپسیس توانایی تولید ترکیبات آلکالوئیدی پیچیده را ندارد با این حال توالی‌یابی ژنوم این گیاه نشان داد که دارای همولوگ برخی از ژن‌های مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای پیچیده از

1. Monoterpenoid indole alkaloids
2. Vinblastine
3. Vincristine
4. Camptothecin
5. Quinone
6. Strictocidine synthase
7. Triptamine
8. Secologanin
9. Strictocidine

خاموشی این ژن باعث عدم تولید لایه اگزین^۴ در دانه گرده شده و نر عقیمی ایجاد می‌شود (Dobritsa *et al.*, 2009).

برخی از ژن‌های *SSL* آراییدوپسیس دارای رابطه تکاملی با پروتئین همومیوسین مگس سرکه می‌باشند لذا این ژن‌ها را شبه همومیوسین^۵ (*HML*) نامیدند (Sohani *et al.*, 2008). بررسی بیان ژن‌های گروه *HML* در آراییدوپسیس نشان داد که ژن‌های شبه همومیوسین فوق در شرایط زخم و تیمار با ترکیبات فعال کننده پیام دفاعی نظیر سالیسیلیک اسید، جاسمونات و اتیلن به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد که نشان دهنده نقش احتمالی این ژن‌ها در مکانیسم دفاعی القائی در گیاه می‌باشد. مطالعه Sohani و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که میزان رونوشت برداری ژن‌های *HML2* (*AT3G51430*)، *HML3* (*AT3G51440*) و *HML4* (*AT3G51450*) القاء پذیر هستند، بدین معنی که در شرایط طبیعی سطح بیان آن‌ها پایین بوده، در حالی که در پاسخ به تنش‌ها و تیمارهای سالیسیلیک اسید، جاسمونات و اتیلن بیان آن‌ها افزایش می‌یابد. سطح بیان *HML1* (*AT3G51420*) مشابه ژن‌های خانه‌دار در همه شرایط ثابت بوده و تغییر معنی‌داری طی تیمارها در بیان آن صورت نمی‌گیرد (Sohani *et al.*, 2008).

عمده مطالعات انجام شده در مورد ژن‌های *SSL* گیاهی مربوط به آراییدوپسیس می‌باشد و تاکنون تحقیق جامعی در مورد ژن‌های *SSL* برنج انجام نشده است. لذا این گزارش، اولین مطالعه سیستماتیک و جامع آنالیز خانواده ژنی *SSL* در برنج می‌باشد که طی آن ۲۳ ژن *SSL* شناسایی شد. علاوه بر این، با استفاده از برخی ابزارهای بیوانفورماتیکی روابط فیلوژنتیکی، عناصر *Cis* ناحیه

جمله *STR* می‌باشد (Facchini *et al.*, 2004). ژن‌های با نقش کارکردی نامشخص که دارای رابطه همولوژی با ژن *STR* پرپوش هستند شبه استریکتوسیدین سینتاز^۱ (*SSL*) نامیده می‌شوند (Kibble *et al.*, 2009).

مطالعات انجام گرفته در مورد ژن‌های *SSL* آراییدوپسیس نشان داده است که این ژن‌ها دارای کارکردهای متفاوتی نسبت به ژن *STR* پرپوش هستند. آنزیم‌های *SSL* آراییدوپسیس توانایی کاتالیز واکنش ترکیب تریپتامین و سکلوگانین و تولید استریکتوسیدین را نداشته و تنها سکولوگانین را به صورت دایمر متابولیده می‌کنند که کارکرد این دایمر مشخص نیست. آنزیم‌های *SSL7* و *SSL14* آراییدوپسیس که به صورت هتروولوگوس در *E. coli* تولید شده‌اند، توانایی کاتالیز واکنش ترکیب تریپتامین با سکلوگانین و تولید استریکتوسیدین را ندارند (Kibble *et al.*, 2009). مطالعه بیش از ۵۰۰ توالی پروتئین *SSL* موجود در بانک‌های اطلاعاتی نشان داد که این پروتئین‌ها توانایی انجام واکنش اصلی را نداشته با این حال واکنش هیدرولیتیک را کاتالیز می‌کنند (Hicks *et al.*, 2011).

ژن *YLS2*^۲ از ژن‌های نشانگر پیری آراییدوپسیس است که حاوی دومین *Str_synth* بوده و از اعضاء خانواده ژنی *SSL* بشمار می‌رود. بیان این ژن در مرحله پیری گیاه و نیز در اثر تیمار با اتیلن، ABA، و پیری القاء شده بوسیله تاریکی افزایش می‌یابد (Yoshida *et al.*, 2001). در آنالیز جهش یافته‌های آراییدوپسیس، جهش یافته *lap3*^۳ شناسایی و بررسی‌های بیشتر نشان داد که پروتئین *LAP3* دارای دومین *Str_synth* می‌باشد. ژن *LAP3* نقش مهمی در نمو دانه گرده داشته و

4. Exine
5. Hemomucin Like

1. Strictocidine Synthase Like
2. Yellow-leaf-specific gene 2
3. Less adherent pollen

پیشبر، ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی، ساختار ژنی، جایگاه ژن‌ها بر روی کروموزوم و مکانیسم مضاعف شدگی آن‌ها بررسی شد. همچنین پروفایل بیانی ژن‌های SSL برنج در شرایط تنش‌های غیر زیستی و بافت‌ها با استفاده از داده‌های ریزآرایه موجود در بانک‌های اطلاعاتی عمومی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این مطالعه می‌تواند به عنوان یک منبع علمی برای آنالیزها و آزمایش‌های کارکردی اعضای خانواده ژنی SSL در برنج باشد.

همردیف سازی و رسم درخت فیلوژنتیکی

بررسی روابط تکاملی بین اعضای یک خانواده ژنی نیازمند همردیف سازی صحیح و رسم درخت فیلوژنتیکی با الگوریتم مناسب می‌باشد. برای رسم درخت فیلوژنتیکی، علاوه بر توالی پروتئین‌های مربوط به SSL برنج، از توالی پروتئین‌های آرابیدوپسیس (Kibbble *et al.*, 2009)، همومیوسین مگس سرکه و انسان، STR پرپوش و راولفیا (*Rauwolfia serpentine*) برای ارزیابی دقیق تر استفاده شد. همردیف سازی پروتئین‌ها با استفاده از نرم افزار ClustalX 2.0.8 (Larkin *et al.*, 2007) و رسم درخت فیلوژنتیکی با نرم افزار MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) با روش اتصال همسایه‌ها (N.J) و آزمون بوت استرپ با هزار تکرار انجام شد.

ساختار ژنی، جایگاه کروموزومی و مضاعف شدگی

ژن‌های OsSSL

الگوی توزیع انترن‌ها و فاز اسپلایسینگ از طریق مقایسه توالی CDS نسبت به DNA ژنومی مربوط به هر ژن با استفاده از سرور GSDS انجام گرفت (Hu *et al.*, 2015). جایگاه ژن‌های SSL بر روی کروموزوم‌های برنج از طریق ابزار chromosomal

ساختار ژنی، ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی، ساختار ژنی، جایگاه ژن‌ها بر روی کروموزوم و مکانیسم مضاعف شدگی آن‌ها بررسی شد. همچنین پروفایل بیانی ژن‌های SSL برنج در شرایط تنش‌های غیر زیستی و بافت‌ها با استفاده از داده‌های ریزآرایه موجود در بانک‌های اطلاعاتی عمومی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این مطالعه می‌تواند به عنوان یک منبع علمی برای آنالیزها و آزمایش‌های کارکردی اعضای خانواده ژنی SSL در برنج باشد.

مواد و روش‌ها

جستجوی بانک‌های اطلاعاتی و شناسایی اعضای

خانواده ژنی SSL برنج

در این مطالعه از دو روش برای شناسایی اعضای خانواده SSL برنج استفاده شد. ابتدا پروفایل HMM دمین Str_synth (PF03088) از پایگاه داده Pfam (Bateman *et al.*, 2004) دریافت و از طریق ابزار HMMsearch برای جستجوی پروتئین‌های SSL برنج در پایگاه داده UniProtKB با پارامترهای پیش فرض استفاده شد (Finn *et al.*, 2011). در روش دوم با استفاده از توالی پروتئین‌های خانواده ژنی SSL آرابیدوپسیس (Kibbble *et al.*, 2009) پایگاه داده پروتئوم برنج (نسخه ۷) در پایگاه داده Phytozome v.11 جستجو شد (Goodstein *et al.*, 2012). سپس توالی‌های تکراری حذف و در نهایت تأیید وجود دومین Str_synth در توالی‌های شناسایی شده با استفاده از پایگاه داده Pfam Scan و hmmscan انجام گرفت (Finn *et al.*, 2011, 2013).

وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک (pI) نظری پروتئین‌های SSL با استفاده از ابزار ProtParam سایت Expasy محاسبه شد (Artimo *et al.*,

به روش RMA بر مبنای Log_2 نرمال شدند. پروب ست اختصاصی ژنهای *OsSSL* از پایگاه داده ricechip دریافت و از آن برای استخراج داده‌های لگاریتمی شدت سیگنال ژنهای *OsSSL* برای آنالیزهای بیشتر استفاده شد. در صورتی که ژنی بیش از دو پروبست داشت از میانگین داده‌های مربوطه استفاده شد. خوشه بندی داده‌های بیانی بر اساس روش اقلیدسی و الگوریتم دورترین همسایه‌ها و رسم نقشه حرارتی با استفاده از نرم افزار Mev4.0 انجام شد.

نتایج و بحث

استریکتوسیدین سینتاز آنزیم کلیدی مسیر بیوستنز MIA در گیاهان می‌باشد (Stockigt *et al.*, 2008). پروتئین‌های همولوگ این آنزیم با کارکرد ناشناخته شبه استریکتوسیدین سینتاز نامیده می‌شوند (Kibble *et al.*, 2009). پروتئین‌های SSL در موجودات مختلف نقش‌های متفاوتی دارند. بعنوان مثال در باکتری‌های گرم منفی در ورود کربوهیدرات‌هایی نظیر ریوز نقش دارند (Hicks *et al.*, 2011). در این مطالعه، ۲۳ ژن کد کننده پروتئین SSL با استفاده از پروفایل HMM دمین و Str_synth و نیز BlastP در ژنوم برنج شناسایی و از نظر روابط فیلوژنتیکی، ساختارهای ژن، جایگاه کروموزومی و مضاعف شدگی و پروفایل بیانی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

شناسایی اعضای خانواده ژنی SSL برنج

در این مطالعه از دو روش بیوانفورماتیکی برای شناسایی اعضای خانواده ژنی SSL استفاده شد. ابتدا با استفاده از پروفایل HMM دمین Str_synth،

map مشخص شد. شناسایی مضاعف شدگی قطعه‌ای از طریق جستجوی پایگاه داده مضاعف شدگی ژنوم گیاهان (PGDD) انجام گرفت (Lee *et al.*, 2012). ژن‌های موجود بر روی یک کروموزوم با فاصله حداکثر بیست ژن از هم بعنوان ژن‌های حاصل از مضاعف شدگی پشت سر هم در نظر گرفته شدند (Liu *et al.*, 2015).

بررسی ناحیه پیشبر^۳ ژن‌های SSL برنج

وجود عناصر Cis acting در ناحیه تنظیمی هر ژن می‌تواند نقش مهمی در پاسخ ژن به محرک‌های محیطی و زیستی داشته باشد. لذا بررسی ناحیه پیشبر خانواده ژنی SSL در گیاه برنج می‌تواند در نتیجه-گیری درباره بیان و کارکرد این ژن‌ها در شرایط بیولوژیکی مفید باشد. برای ارزیابی عناصر تنظیمی ناحیه پیشبر ژن‌های *OsSSL* ۱۵۰۰ جفت باز توالی DNA ژنومی بالا دست کدون شروع (ATG) ژن‌ها از سایت Phytozome (Goodstein *et al.*, 2012) دریافت و شناسایی عناصر تنظیمی مربوط به تنش‌ها و پاسخ به هورمون‌ها با استفاده از PlantCare^۴ انجام شد (Lescot *et al.*, 2002).

پروفایل بیانی ژن‌های *OsSSL*

بررسی پروفایل بیانی خانواده ژنی SSL برنج در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی و مراحل نمو با استفاده از داده‌های ریزآرایه Affymetrix Rice Genome Array موجود در بانک اطلاعاتی GEO^۵ انجام شد. شماره دسترسی این داده‌ها در GEO برای تنش‌های غیر زیستی GSE6901 و مراحل نمو GSE6893 است. داده‌های خام با فرمت CEL با استفاده از نرم‌افزار RMAExpress (Bolstad *et al.*, 2005)

6. Robust Multiarray Average
7. www.ricechip.org
8. Complete Linkage
9. Heatmap

1. <http://viewer.shigen.info/oryzavw/maptool/MapTool.do>
2. Segmental
3. Promoter
4. Bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/
5. Gene Expression Omnibus

شیمیایی این خانواده ژنی با استفاده از ابزار آنالیز پروتئین ExpASY (Artimo *et al.*, 2012) نشان داد که این ژن‌ها از نظر تعداد آمینو اسید، وزن مولکولی و pI باهم تفاوت دارند. طول پروتئین‌های این خانواده از ۱۶۰ تا ۴۸۱ اسید آمینه و وزن مولکولی آن‌ها از ۱۶/۸۸ تا ۵۳/۷ کیلودالتون است. دامنه نقطه ایزوالکتریک این پروتئین‌ها از ۴/۶۵ در OsSSL13 تا ۱۰/۲۹ در OsSSL5 می‌باشد. مکان‌یابی پروتئین‌ها OsSSL نشان داد که جایگاه عمده این پروتئین‌ها کلروپلاست است. همچنین جایگاه سلولی برخی میتوکندری، هسته، خارج سلولی و غشای پلاسمایی پیش‌بینی شد. وجود تنوع مکانی برای پروتئین‌های OsSSL احتمالاً نشان دهنده نقش‌های کارکردی متنوع این ژن‌ها در فرآیندهای مختلف سلول می‌باشد (جدول ۱).

پایگاه داده UniProtKB جستجو و ۴۱ توالی پروتئینی برای برنج شناسایی شد. در روش دوم از طریق PlastP توالی پروتئینی ژن‌های SSL، آرآیدوپسیس ۲۶ توالی پروتئینی برنج در پایگاه داده Phytozom شناسایی شد. جهت اطمینان از وجود dmین Str_synth تمامی توالی‌های شناسایی شده از طریق پایگاه داده‌های Pfam Scan و hmmscan ارزیابی شده و پروتئین‌های فاقد dmین Str_synth حذف شدند. در نهایت با حذف توالی‌های تکراری ۲۳ جایگاه ژنی SSL در ژنوم برنج شناسایی شد. برای نامگذاری ژن‌ها، روشی مورد استفاده قرار گرفت که بیشتر در مورد پروتئین‌های NAC سیب‌زمینی، WRKY ذرت، NCX آرآیدوپسیس و برنج نیز استفاده شده بود (Singh *et al.* 2013; Wei *et al.* 2015). مطالعات فیزیکی

جدول ۱. مشخصات اعضاء خانواده ژنی SSL برنج

ژن	پروتئین	شماره دسترسی	امتیاز dmین	طول پروتئین	نقطه ایزوالکتریک	وزن مولکولی	جایگاه سلولی
OsSSL1	OsSSL1	LOC_Os01g50330	3.00E-23	325	6.05	35.272	کلروپلاست
OsSSL2	OsSSL2	LOC_Os03g15710	6.00E-30	428	6.7	47.801	میتوکندری/کلروپلاست
OsSSL3	OsSSL3	LOC_Os03g53950	1.20E-28	481	8.59	53.706	کلروپلاست
OsSSL4	OsSSL4	LOC_Os04g59300	6.90E-04	257	8.52	27.4	غشای پلاسمایی/کلروپلاست
OsSSL5	OsSSL5	LOC_Os06g35950	7.50E-06	170	10.29	18.92	هسته
OsSSL6	OsSSL6	LOC_Os06g41820	1.90E-23	346	9.95	37.545	میتوکندری/کلروپلاست
OsSSL7	OsSSL7	LOC_Os06g41830	2.40E-23	330	9.6	35.642	خارج سلولی
OsSSL8	OsSSL8	LOC_Os06g41850	1.30E-23	351	10.08	38.168	میتوکندری
OsSSL9	OsSSL9	LOC_Os07g35970	1.20E-22	351	8.95	37.417	کلروپلاست
OsSSL10	OsSSL10	LOC_Os07g35990	1.40E-22	251	9.21	27.075	میتوکندری/کلروپلاست
OsSSL11	OsSSL11	LOC_Os07g36040	1.40E-22	249	9.43	26.979	میتوکندری/کلروپلاست
OsSSL12	OsSSL12	LOC_Os07g36060	2.90E-22	352	8.71	37.759	خارج سلولی/کلروپلاست
OsSSL13	OsSSL13	LOC_Os07g42250	3.60E-24	368	4.65	39.656	کلروپلاست
OsSSL14	OsSSL14	LOC_Os08g07810	2.70E-23	358	6.6	38.064	کلروپلاست
OsSSL15	OsSSL15	LOC_Os08g34330	9.70E-24	351	8.09	38.039	کلروپلاست
OsSSL16	OsSSL16	LOC_Os09g20684	5.50E-27	365	8.43	38.193	کلروپلاست
OsSSL17	OsSSL17	LOC_Os09g20700	6.80E-05	227	8.94	24.26	کلروپلاست
OsSSL18	OsSSL18	LOC_Os09g20720	1.80E-11	160	6.34	16.881	کلروپلاست
OsSSL19	OsSSL19	LOC_Os09g20810	8.60E-29	363	9.05	38.014	کلروپلاست
OsSSL20	OsSSL20.1	LOC_Os10g39710	1.90E-32	369	5.25	39.5	کلروپلاست
	OsSSL20.2	LOC_Os10g39710	1.20E-32	287	4.73	30.32	کلروپلاست
OsSSL21	OsSSL21	LOC_Os11g04660	4.50E-29	372	9	41.185	کلروپلاست
OsSSL22	OsSSL22.1	LOC_Os12g04424	1.70E-29	431	9.04	47.761	کلروپلاست
	OsSSL22.2	LOC_Os12g04424	1.3E-29	371	6.98	40	کلروپلاست
OsSSL23	OsSSL23	LOC_Os12g09390	3.60E-04	333	9.74	36.22	هسته

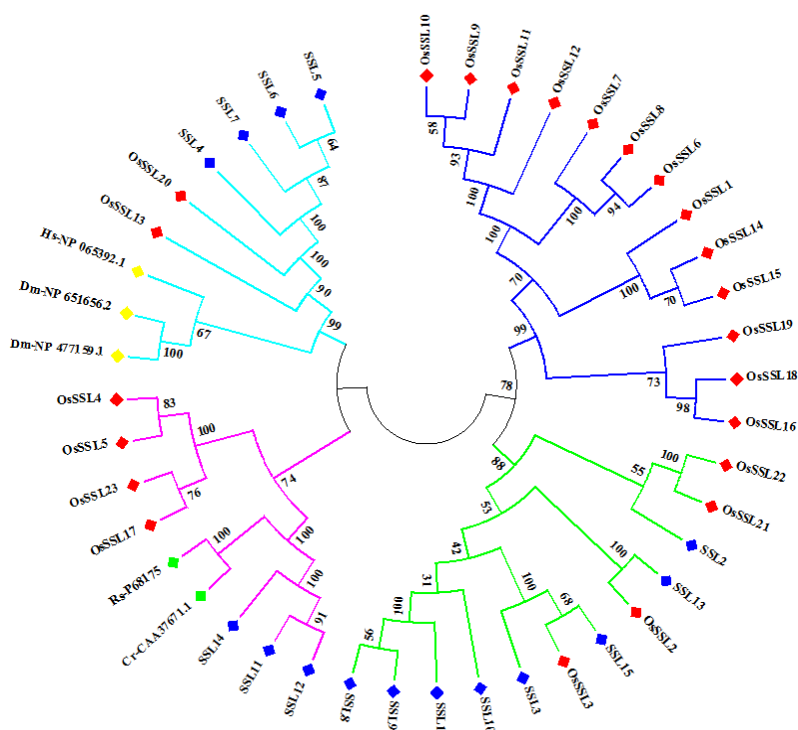
آنالیز فیلوژنتیکی خانواده ژنی *SSL* برنج

برای درک بهتر روابط تکاملی و فیلوژنتیکی خانواده ژنی *SSL*، درخت فیلوژنتیکی با روش NJ و بر اساس همردیف سازی چندگانه طول کامل پروتئین‌های *SSL* برنج و آرابیدوپسیس، همومیوسین انسان و مگس سرکه و *STR* پریوش و راولفیا ایجاد شد. آنزیم *STR* راولفیا همانند آنزیم *STR* پریوش دارای فعالیت استریکتوسینتازی می‌باشد (Ma et al., 2006). بر اساس امتیاز بوت استرپ (Felsenstein, 1985)، پروتئین‌ها در چهار گروه متفاوت قرار گرفتند (شکل ۱). گروه یک از ژن‌های *SSL* برنج تشکیل شده است و با ۱۳ عضو بزرگترین زیر خانواده محسوب می‌شود. گروه دو شامل ژن‌های *OsSSL2*، *OsSSL3*، *OsSSL21* و *OsSSL22* همراه با ۸ ژن آرابیدوپسیس می‌باشد. گروه ۳ شامل ژن‌های *OsSSL4*، *OsSSL5*، *OsSSL17* و *OsSSL23* برنج و سه ژن *SSL* آرابیدوپسیس و *CrSTR* و *RsSTR* می‌باشد. جدا شدن ژن‌های *SSL* برنج در گروه سه و ایجاد یک زیر گروه مجزا می‌تواند به علت رابطه تکاملی بین این چهار گیاه باشد، زیرا برنج گیاهی تک‌لپه است در حالی که آرابیدوپسیس، پریوش و راولفیا دولپه‌ای بوده و رابطه تکاملی نزدیکی دارند. وجود رابطه تکاملی نزدیک در گیاهان دولپه نسبت به گیاهان تک‌لپه در سایر خانواده‌های ژنی نیز مشاهده شده است. بعنوان مثال خانواده ژنی *TIFY* آرابیدوپسیس و انگور در مقایسه با این خانواده در برنج دارای رابطه تکاملی نزدیکتری هستند (Zhang et al., 2012). وجود رابطه تکاملی نزدیک در تک‌لپه‌ای‌ها نسبت به دولپه‌ای‌ها (و برعکس) در مورد خانواده ژنی *HDZ IV*^۱ نیز مشاهده می‌شود (Pandey et al., 2016). ژن‌های *CrSTR* و *RsSTR* دارای فعالیت استریکتوسیدین سینتازی

می‌باشند (Memelink et al., 2007; Ma et al., 2006). به نظر می‌رسد کارکرد ژن‌های اورتولوگ گونه‌های مختلف در هر کلاد به احتمال زیاد و نه کاملاً حفاظت شده باشد در حالی که ژن‌های پارالوگ حاصل از مضاعف شدگی احتمالاً در جهت کارکرد بیولوژیکی جدید نسبت به ژن جد خود تکامل یابند (Geo et al., 2008). لذا ژن‌های *SSL* برنج و آرابیدوپسیس که در این گروه قرار دارند از نظر تکاملی احتمالاً توانایی کاتالیز ترکیب تریپتامین و سکولوگابین و تولید استریکتوسیدین را دارند. *SSL14* آرابیدوپسیس با شباهت ۵۴٪ و تطابق ۳۷٪ نزدیک‌ترین رابطه تکاملی را با ژن *CrSTR* دارد اما در آزمایشی که بر روی این ژن انجام شد؛ بیان هترولوگوس آن در *E. coli* قادر به کاتالیز واکنش استریکتوسیدین سینتازی نبود (Kibble et al., 2009). در گروه چهارم این درخت فیلوژنتیکی ژن‌های *OsSSL13* و *OsSSL20* برنج و ژن‌های شبه همومیوسین آرابیدوپسیس در کنار ژن‌های همومیوسین انسان و مگس سرکه قرار گرفتند (شکل ۱). با توجه به ماهیت ژن‌های همومیوسین در پاسخ ایمنی مگس سرکه (Theopold et al., 1996)، می‌توان گفت ژن‌های *SSL* آرابیدوپسیس و برنج موجود در گروه چهار می‌توانند در فرآیندهای پاسخ به تنش‌ها نقش داشته باشند. از نظر تکاملی نوع قرار گرفتن ژن‌های *SSL* آرابیدوپسیس و برنج در گروه‌های درخت فیلوژنتیکی احتمالاً نشان‌دهنده وجود ژن‌های *SSL* قبل از جدا شدن گیاهان تک لپه و دولپه در طی تکامل می‌باشد. با این حال گروه یک تنها از ژن‌های برنج تشکیل شده است که دلیلی بر تفاوت مسیر تکاملی خانواده ژنی *SSL* در آرابیدوپسیس و برنج باشد. تفاوت مشاهده شده در این گروه از درخت فیلوژنتیکی می‌تواند به دلیل حذف برخی از ژن‌های *SSL* در

برای اهلی سازی در طول زمان مورد گزینش قرار گرفته است، می توان نتیجه گرفت این گزینش احتمالاً بر روی تکامل ژن های *SSL*، برنج تاثیر گذار بوده است (Nakano *et al.*, 2006).

آراییدوپسیس و یا ایجاد برخی از ژن های *SSL* در برنج در طی تکامل این گیاهان بعد از انشقاق گیاهان تک لپه و دولپه در ۱۴۰ تا ۱۵۰ میلیون سال قبل باشد (Chaw *et al.*, 2003). از آنجا که برنج یک گیاه زراعی بوده و



شکل ۱. درخت فیلوژنتیکی خانواده ژنی *OsSSL*. رسم درخت به روش N.J با آزمون بوت استرپ ۱۰۰۰ (Felsenstein, 1985) انجام شد. چهار گروه درخت فیلوژنتیکی به ترتیب با رنگ های آبی، سبز، صورتی و فیروزه ای مشخص شده اند. ژن های *SSL* برنج به رنگ قرمز، ژن های *SSL* آراییدوپسیس به رنگ آبی، ژن های *STR* به رنگ سبز و ژن های همومیوسین به رنگ زرد نشان داده شده اند.

مکان ژن ها بر روی کروموزوم، مضاعف شدگی و ساختار ژنی

توزیع ۲۳ عضو خانواده ژنی *SSL* روی کروموزوم های برنج یکنواخت نبوده و کروموزوم ۷ حاوی ۵ ژن و به عبارتی ۲۱/۷۳ درصد از ژن ها می باشد، در حالی که هیچکدام از اعضاء این خانواده ژنی بر روی کروموزوم های شماره ۲ و ۵ وجود ندارد (شکل ۲). کروموزوم های ۶ و ۹ حاوی ۴ ژن از این خانواده می باشند. کروموزوم های ۳، ۸ و ۱۲ حاوی دو ژن و کروموزوم های ۱، ۴، ۱۰ و ۱۱ دارای یک ژن *SSL* هستند (شکل ۲). مضاعف شدگی ژن از

مکانیسم های مهم در افزایش تنوع ژنتیکی و ایجاد ژن های جدید می باشد. در گیاهان این مکانیسم عامل اصلی در افزایش اندازه خانواده ژنی است (Magadum *et al.*, 2013). با جستجوی بانک اطلاعات مضاعف شدگی گیاهان (PGDD) وجود مضاعف شدگی قطعه ای مابین ژن *OsSSL22* و LOC_Os11g04650 مشخص شد. LOC_Os11g04650 از جمله ژن هایی بود که بعلت نداشتن دومین *Str_synth* جزء خانواده ژنی *SSL* برنج محسوب نمی شود. بررسی دمین های LOC_Os11g04650 نشان داد که این پروتئین

مکان ژن ها بر روی کروموزوم، مضاعف شدگی و ساختار ژنی

توزیع ۲۳ عضو خانواده ژنی *SSL* روی کروموزوم های برنج یکنواخت نبوده و کروموزوم ۷ حاوی ۵ ژن و به عبارتی ۲۱/۷۳ درصد از ژن ها می باشد، در حالی که هیچکدام از اعضاء این خانواده ژنی بر روی کروموزوم های شماره ۲ و ۵ وجود ندارد (شکل ۲). کروموزوم های ۶ و ۹ حاوی ۴ ژن از این خانواده می باشند. کروموزوم های ۳، ۸ و ۱۲ حاوی دو ژن و کروموزوم های ۱، ۴، ۱۰ و ۱۱ دارای یک ژن *SSL* هستند (شکل ۲). مضاعف شدگی ژن از

بیشتر ژن‌های *SSL* آرابیدوپسیس در پاسخ به تنش‌ها بسیار محتمل است.

بررسی ساختار اگزون اینترونی خانواده ژنی *SSL* نشان داد که این ژن‌ها از صفر تا ۵ اینترون داشته و تنوع ساختاری بالایی دارند (شکل ۳). نزدیک به ۳۵ درصد ژن‌های *SSL* برنج فاقد اینترون هستند. در یوکاریوتها سه روش برای ایجاد ژن‌های بدون اینترون وجود دارد که شامل انتقال افقی ژن از پروکاریوت‌ها، مضاعف شدن ژن فاقد اینترون و رتروپوزاسیون می‌باشد (Huang *et al.*, 2015). بنظر می‌رسد ژن‌های فاقد اینترون در خانواده ژنی *OsSSL* احتمالاً بواسطه روش دوم بوجود آمده‌اند، زیرا تمامی این ژن‌ها در نتیجه مضاعف شدگی پشت سر هم ایجاد شده‌اند. طولترین اینترون مربوط به ژن *OsSSL16* می‌باشد به همین علت طولترین داده‌های ساختار ژنی معلوم شد که ۲ ژن *OsSSL20* و *OsSSL22* دارای دو نوع سیستم اسپلایسینگ می‌باشد و در نتیجه ۲۳ ژن *OsSSL* توانای کد کردن ۲۵ پروتئین را دارند (شکل ۳). اسپلایسینگ اینترون بر اساس جایگاه انجام آن به سه فاز تقسیم می‌شود. فاز ۱ که در آن اسپلایسینگ در اولین نوکلئوتید بعد از کدون انجام می‌شود. فاز دو در دومین نوکلئوتید بعد از کدون و فاز صفر نیز در سومین نوکلئوتید بعد از کدون ایجاد می‌شود (Sharp, 1981). اسپلایسینگ اینترون‌ها در خانواده ژنی *SSL* برنج از نوع فاز صفر و دو هست که ژن‌های *OsSSL4*، *OsSSL13*، *OsSSL20* و *OsSSL23* دارای هر دو فاز اسپلایسینگ صفر و دو می‌باشند. ژن‌های *OsSSL1* و *OsSSL5* تنها فاز اسپلایسینگ صفر دارند و سایر ژن‌های عضو این خانواده تنها اسپلایسینگ فاز دو دارند (شکل ۳). ژن *OsSSL17* اگرچه همراه با ژن‌های *OsSSL16*، *OsSSL18* و *OsSSL19* به صورت کلاستر بر روی کروموزوم ۹ قرار داشته و نتیجه مضاعف شدگی پشت سر هم

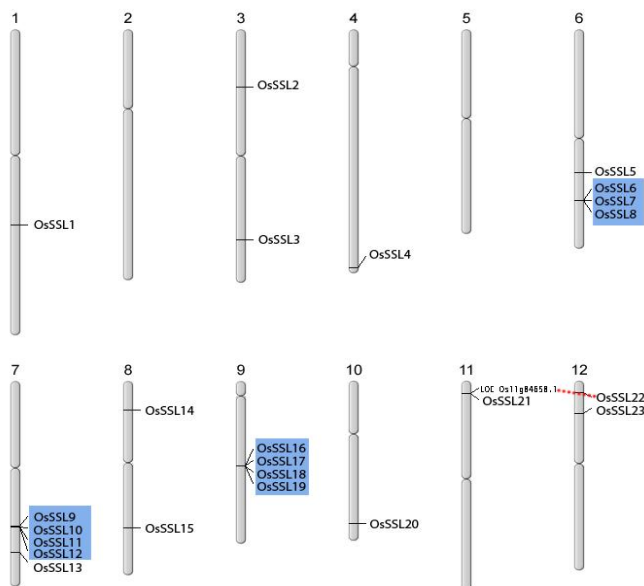
جزء آریل‌استرازها^۱ (سرم پارالوکسناز)^۲ می‌باشد. در واقع آنزیم‌های N6P بر اساس شباهت توالی به سه زیر گروه *SSL*، *SGL* و آریل‌استراز تقسیم می‌شوند (Hicks *et al.*, 2011). لذا احتمالاً یک رابطه تکاملی بین این سه زیرگروه آنزیمی وجود دارد. مضاعف شدگی پشت سر هم به وفور در این خانواده اتفاق افتاده است. ژن‌های *OsSSL6*، *OsSSL7* و *OsSSL8* بر روی کروموزوم شش و چهار ژن *OsSSL9*، *OsSSL10*، *OsSSL11* و *OsSSL12* بر روی کروموزوم ۷ حاصل مضاعف شدگی پشت سر هم می‌باشند. ژن‌های *OsSSL16*، *OsSSL17*، *OsSSL18* و *OsSSL19* بر روی کروموزوم شماره ۳ نیز به روش مضاعف شدگی پشت سر هم ایجاد شده‌اند (شکل ۲). لذا نقش مضاعف شدگی پشت سر هم در افزایش تعداد اعضاء این خانواده ژنی بسیار بیشتر از مضاعف شدگی قطعه‌ای بوده و نزدیک به ۴۸ درصد ژن‌های خانواده *OsSSL* از طریق مضاعف شدگی پشت سر هم ایجاد شده است.

از نظر کارکردی، تحت شرایط گزینش طبیعی، ژن‌های حاصل از مضاعف شدگی پشت سر هم بخشی از سازگاری تکاملی موجود نسبت به تغییرات سریع محیط بوده و در پاسخ نسبت به تنش‌های زیستی و محرک‌های محیطی نقش دارند (Hanada *et al.*, 2008). بعنوان مثال مقاومت سورگوم در تحمل خشکی مربوط به ژن‌های حاصل از مضاعف شدگی می‌باشد (Paterson *et al.*, 2009). همچنین بخش عمده‌ای از دو خانواده ژنی -Leu rich repeat و receptor kinaseها که نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های زیستی دارند حاصل مضاعف شدگی پشت سر هم می‌باشد (Hanada *et al.*, 2008). بنابر این ایفای نقش کارکردی برای

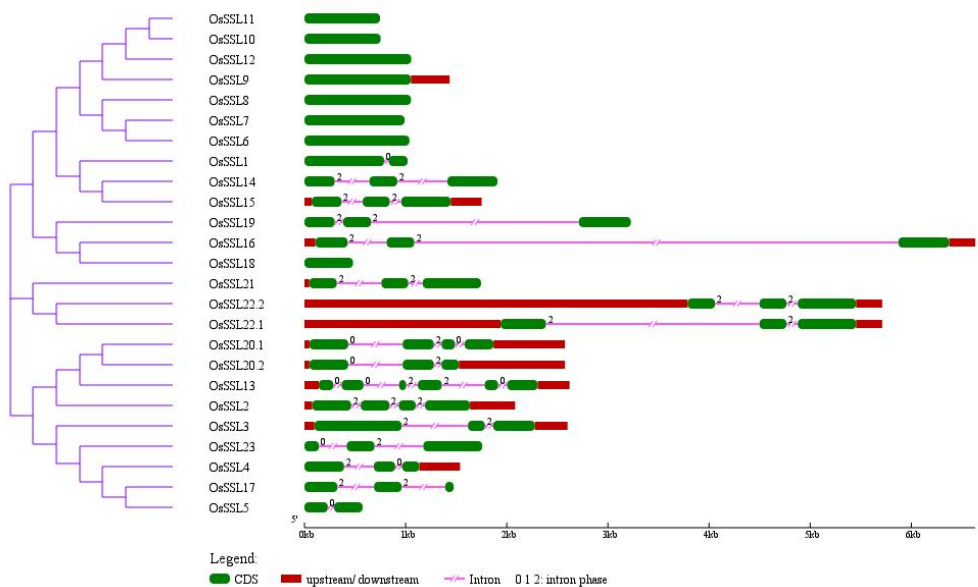
1. Arylesterase
2. Serum paraoxonase
3. SMP-30/Gluconolactonase/LRE-like region
4. Tandem

کدکننده خود دچار تغییر می‌شوند. تغییر در ناحیه کدکننده، بویژه اگر موجب تغییر در کارکرد شود، از طریق جایگزینی در اسیدهای آمینه یا تغییر در ساختار اگزون-اینترون حادث می‌شود (Xu *et al.*, 2011).

می‌باشند با این حال، چه از نظر ساختار ژنی و چه از نظر فیلوژنتیکی با ۳ ژن دیگر متفاوت بوده و احتمالاً نقش کارکردی متفاوتی پیدا کرده است (شکل ۳). باید توجه داشت که اگر ژن‌های مضاعف شده در طی تکامل حفظ شوند، عموماً در نواحی تنظیمی یا



شکل ۲. مکان ژن‌های *OsSSL* بر روی کروموزوم‌های برنج. شماره کروموزوم‌ها در بالای هر کروموزوم نوشته شده است. ژن‌های حاصل از مضاعف شدگی پشت سر هم در داخل کادر آبی رنگ و ژن‌های حاصل از مضاعف شدگی قطعاتی با خط قرمز مشخص شده‌اند.



شکل ۳. ساختار اگزون-اینترونی ژن‌های *OsSSL* و روابط فیلوژنتیکی آن‌ها، اگزون، اینترون و UTR به ترتیب با رنگ‌های سبز،

صورتی و قرمز مشخص شده‌اند. شماره‌ها مربوط به فاز اسپلایسینگ می‌باشد.

و همچنین در رشد و نمو گیاه نیز نقش دارد (Cutler *et al.*, 2010). فراوانی بالای عناصر تنظیمی پاسخ به جاسمونات و ABA و همچنین وجود عناصر تنظیمی پاسخ به خشکی، حرارت، سرما، پاتوژن‌ها، الیستورهای قارچی اکسین، جیبرلین و اتیلن می‌تواند نشان‌دهنده مداخله این ژن‌ها در طیف وسیعی از فرآیندهای پاسخ به تنش‌ها از طریق مکانیسم‌های پیچیده باشد (جدول ۲). باید توجه داشت وجود عناصر تنظیمی پاسخ به یک محرک خاص دلیل قطعی برای بیان آن ژن در واکنش به آن محرک نیست. مطالعه ناحیه پیشبر خانواده ژنی سیستم‌های دو جزئی^۱ Chinese Cabbage (*Brassica rapa ssp. pekinensis*) نشان داد که برخی از ژن‌های این خانواده در ناحیه پیشبر خود غنی از عناصر تنظیمی پاسخ به ABA هستند با این حال بیان آن‌ها در پاسخ به این هورمون القاء نمی‌شود. این امر می‌تواند به دلیل پیچیده بودن مکانیسم تنظیم بیان ژن‌ها و نیز محدودیت روش‌های بیوانفورماتیکی پیش‌بینی عناصر تنظیمی ناحیه پیشبر ژن‌ها باشد (Liu *et al.*, 2014). لذا برای شناسایی عناصر تنظیمی کارکردی در ناحیه پیشبر ژن‌های *OsSSL* استفاده از روش‌های آزمایشگاهی نظیر qRT-PCR ضروری می‌باشد.

بررسی بیان ژن‌های خانواده *SSL* آرابیدوپسیس بر پایه اطلاعات ریزآرایه

مطالعه پروفایل بیان ژن‌های با کارکرد نامشخص می‌تواند روش مناسب برای درک نقش آن‌ها در پاسخ به تنش‌ها و نیز مراحل نمو گیاه باشد (Singh *et al.*, 2015). لذا برای به دست آوردن اطلاعاتی در مورد نقش احتمالی ژن‌های *SSL* برنج در پاسخ به تنش‌ها و نیز مراحل نمو از داده‌های ریزآرایه

بررسی ناحیه پیشبر ژن‌های *OsSSL*

هر ژن در ناحیه تنظیمی خود دارای ترکیب منحصر به فردی از عناصر تنظیمی می‌باشد که بیان آن را از نظر زمانی، مکانی و در پاسخ به محرک‌های مختلف تنظیم می‌کنند، لذا درک جامع از این عناصر تنظیمی و نحوه کنترل بیان ژن می‌تواند در تعیین نقش ژن کارآمد باشد (Ibraheem *et al.*, 2010).

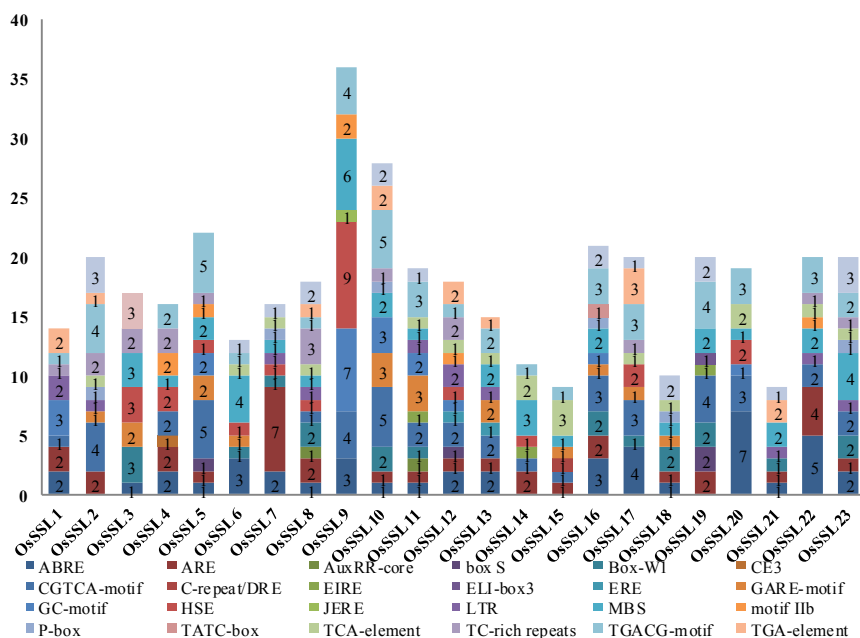
برای حصول درک بیشتر در مورد مکانیسم تنظیم رونویسی ژن‌های *OsSSL* جستجوی عناصر سپس در واکنش به تنش‌ها و هورمون‌ها در ناحیه ۱/۵ کیلو باز بالادست این ژن‌ها با استفاده از پایگاه داده PlantCare انجام شد. نتیجه این آنالیز شناسایی ۲۶ نوع مختلف از عناصر تنظیمی *cis* برای پاسخ به تنش‌ها و هورمون‌ها در ناحیه پیشبر این خانواده بود که در مجموع شامل ۴۱۱ عنصر تنظیمی شد. فراوانی این عناصر در ناحیه تنظیمی هر یک از ژن‌ها و نیز فراوانی کلی آن‌ها بسیار متنوع بود (شکل ۴)، به طوری که فراوانی عناصر تنظیمی -TGACG motif، CGTCA-motif، ABRE و MBS به ترتیب ۱۱/۹، ۱۱/۴۳، ۱۰/۷ و ۹/۹۷ درصد کل عناصر تنظیمی می‌باشد (جدول ۲). عناصر تنظیمی -TGACG motif و -CGTCA motif بر روی ژن‌هایی قرار دارند که به متیل جاسمونات پاسخ می‌دهند (Dong and Shang, 2013). همچنین ABRE و MBS به ترتیب عناصر تنظیمی پاسخ به آبسزیک اسید و خشکی می‌باشد (Dong and Shang, 2013). هورمون‌های جاسمونات و ABA در طی وسیعی از فریندهای زیستی گیاهان نقش دارند. جاسمونات در جوانه زنی بذر، گلدهی، نمو میوه، ریزش برگ، پیری و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش دارد (Cao *et al.*, 2016). هورمون ABA به عنوان هورمون تنش شناخته می‌شود. این هورمون در پاسخ به تنش‌ها نقش اصلی را ایفا کرده

OsSSL6، *OsSSL7* و *OsSSL8* یک پروب ست مشترک شناسایی شد همچنین ژن‌های *OsSSL9*، *OsSSL10*، *OsSSL11* و *OsSSL12* نیز یک پروب ست مشترک داشتند. لذا نمی‌توان از این پروب ست‌ها برای ارزیابی بیان این ژن‌ها استفاده کرد، زیرا نتایج آن قابل تفسیر نیست (Fujita et al., 2010). برای ژن‌های *OsSSL17*، *OsSSL18* و *OsSSL19* پروب ست شناسایی نشد.

عمومی در دسترس (سایت GEO) استفاده شد، زیرا ریزآرایه‌ها ابزار مهمی برای آنالیز ژن‌های مورد نظر در سطح رونویسی می‌باشند. در این بررسی بیان ژن‌های *OsSSL1*، *OsSSL2*، *OsSSL3*، *OsSSL4*، *OsSSL5*، *OsSSL13*، *OsSSL14*، *OsSSL15*، *OsSSL16*، *OsSSL20*، *OsSSL21*، *OsSSL22* و *OsSSL23* مورد ارزیابی قرار گرفتند، زیرا دارای پروب ست اختصاصی بودند. برای سه ژن

جدول ۲. فراوانی و کارکرد عناصر تنظیمی شناسایی شده در ناحیه پیشبر ژن‌های *OsSSL*

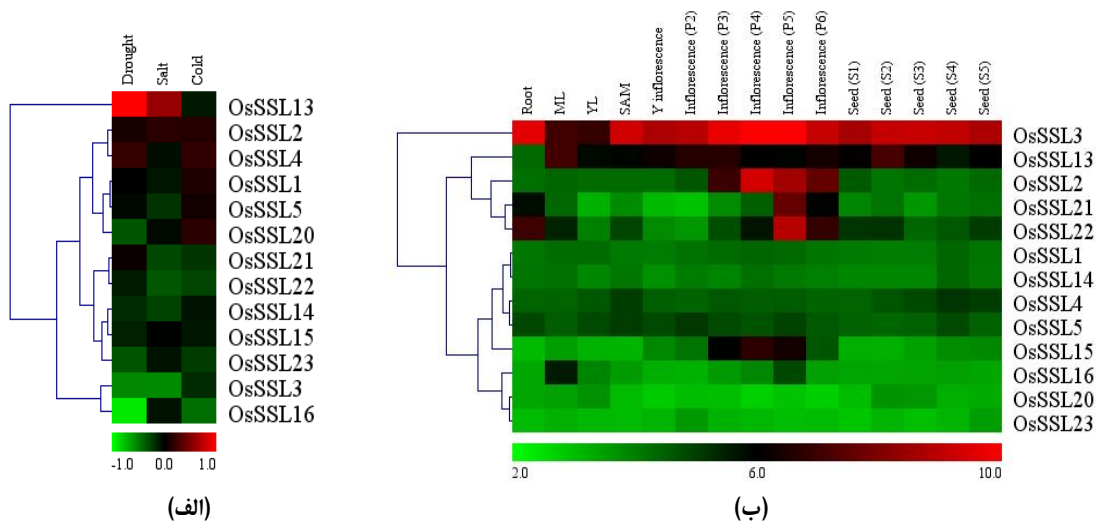
عناصر تنظیمی	فراوانی	کارکرد	عناصر تنظیمی	فراوانی	کارکرد
HSE	24	عنصر پاسخ به شوک حرارتی	ABRE	44	عنصر پاسخ به آپسیزیک اسید
JERE	1	عنصر پاسخ به زخم، پاتوژن و الیستور	ARE	34	عنصر پاسخ به شرایط بی‌هوایی
LTR	12	عنصر پاسخ به دمای پایین	AuxRR-core	2	عنصر پاسخ به اکسین
MBS	41	عنصر پاسخ به خشکی	box S	4	عنصر پاسخ به زخم، پاتوژن و الیستور
motif IIb	7	عنصر پاسخ به آپسیزیک اسید	Box-W1	20	عنصر پاسخ به الیستورهای قارچی
P-box	6	عنصر پاسخ به جبرلین	CE3	1	عنصر پاسخ به آپسیزیک اسید
TATC-box	1	عنصر پاسخ به جبرلین	CGTCA-motif	47	عنصر پاسخ به متیل جازمونات
TCA-element	18	عنصر پاسخ به سالیسیلیک اسید	C-repeat/DRE	1	عنصر پاسخ به خشکی و سرما
TC-rich repeats	17	عنصر پاسخ به تنش‌ها	EIRE	3	عنصر پاسخ به الیستور
TGACG-motif	49	عنصر پاسخ به متیل جازمونات	ELI-box3	1	عنصر پاسخ به الیستور
TGA-element	14	عنصر پاسخ به اکسین	ERE	2	عنصر پاسخ به اتیلن
W box	21	عنصر پاسخ به پاتوژن	GARE-motif	18	عنصر پاسخ به جبرلین
WUN-motif	3	عنصر پاسخ به زخم	GC-motif	20	involved in anoxic specific inducibility



شکل ۴. عناصر تنظیمی شناسایی شده در ناحیه پیشبر ژنهای *OsSSL* و فراوانی آنها در هر ژن، ناحیه ۱۵۰۰ جفت باز بالا دست کدون شروع هر ژن با استفاده از پایگاه داده PlantCARE برای شناسایی عناصر تنظیمی پاسخ به تنش‌ها و نیز هورمون‌ها جستجو شد.

سرکوب شده است (شکل ۵-الف). تنش‌های خشکی و سرما به ترتیب موجب سرکوب و افزایش بیان ژن *OsSSL20* می‌شوند (شکل ۵-الف). بیان سایر ژن‌های مورد بررسی در اثر تنش‌های شوری، خشکی و سرما سرکوب شده یا تغییر نکرده است (شکل ۵-الف). بیان ژن‌های *SSL7-SSL4* آراییدوپسیس در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی القاء می‌شوند که نشان دهنده نقش این ژن‌ها در پاسخ آراییدوپسیس نسبت به تنش‌ها می‌باشد (Sohani *et al.*, 2008; K bible *et al.*, 2009). لذا می‌توان گفت ژن‌های *OsSSL* نیز در پاسخ برنج نسبت به تنش‌ها نقش دارند.

بر اساس پروفایل بیانی داده‌های ریزآرایه‌ها در شرایط تنش‌های غیر زیستی، بیشترین افزایش بیان مربوط به ژن *OsSSL13* در اثر تنش‌های خشکی و شوری می‌باشد. احتمالاً سرما تأثیر محدودی بر تغییر بیان این ژن دارد. بیان ژن‌های *OsSSL4* و *OsSSL2* در اثر تنش‌های خشکی و سرما تا حدودی افزایش یافته است. همچنین تأثیر تنش شوری بر بیان این دو ژن به ترتیب نشان‌دهنده افزایش بیان در ژن *OsSSL2* و عدم تغییر بیان در ژن *OsSSL4* است. تنش سرما باعث افزایش بیان ژن‌های *OsSSL1* و *OsSSL5* می‌شود، همچنین بیان این ژن‌ها در اثر تنش شوری



شکل ۵. آنالیز بیان ژن‌های *OsSSL* با استفاده از داده‌های ریزآرایه در پاسخ به تنش‌های خشکی، شوری، سرما (الف)، بافت‌های مختلف (ب). داده‌های ریزآرایه بر اساس روش RMA و بر مبنای \log_2 نرمال شدند. مقیاس رنگ برای میزان بیان که سبز برای حداقل، سیاه برای متوسط و قرمز برای حداکثر بیان در زیر هر شکل قرار گرفته است. برگ جوان ML، برگ جوان YL، مریستم انتهایی SAM، خوشه جوان صفر تا ۳ سانتی‌متر، ۳ تا ۵ سانتی‌متری (P2)، ۵ تا ۱۰ سانتی‌متری (P3)، ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متری (P4)، ۱۵ تا ۲۲ سانتی‌متری (P5)، ۲۲ تا ۳۰ سانتی (P6). بذر صفر تا ۲ روز بعد از گرده افشانی (S1)، ۳ تا ۴ روز بعد از گرده افشانی (S2)، ۵ تا ۱۰ روز بعد از گرده افشانی (S3)، ۱۱ تا ۲۰ روز بعد از گرده افشانی (S4) و ۲۱ تا ۲۹ روز بعد از گرده افشانی (S5).

ژن *OsSSL13* در ریشه سرکوب شده ولی در سایر مراحل تغییر شدیدی در بیان آن رخ می‌دهد. به نظر می‌رسد بیان ژن‌های *OsSSL2*، *OsSSL21* و

در مراحل نموی و بافت‌های گیاهی، بیشترین بیان مربوط به ژن *OsSSL3* است که در تمام بافت‌ها بیان بالایی از خود نشان می‌دهد (شکل ۵-ب). بیان

در تنش‌های مختلف و نیز مراحل نموی رویشی و زایشی لازم به نظر می‌رسد.

مطالعه حاضر اولین مطالعه جامع در مورد شناسایی و آنالیز خانواده ژنی *SSL* در برنج می‌باشد. ۲۳ ژن *OsSSL* شناسایی شده در این مطالعه همراه با ژن‌های *SSL* آراییدوپسیس چهار گروه فیلوژنتیکی ایجاد کردند که نتایج این گروه بندی حاکی از مسیر تکاملی متفاوت خانواده ژنی *SSL* در برنج و آراییدوپسیس می‌باشد. نقشه یابی کروموزومی و آنالیز تکاملی نشان داد که ترانسپوزاسیون و مضاعف شدگی پشت سر هم عامل اصلی بسط ژن‌های *OsSSL* هست. بر اساس بررسی پروفایل بیانی داده‌های ریزآرایه مشخص شد که بیان ژن‌های *OsSSL* در بافت‌های مختلف متفاوت بوده و برخی از ژن‌های *OsSSL* در همه بافت‌ها بیان بالایی دارند. درحالی‌که برخی اختصاصی یک بافت هستند. همچنین در پاسخ به تنش‌های شوری، سرما و خشکی بیان این ژن‌ها تغییر می‌کند. نتایج این مطالعه می‌تواند اطلاعات پایه در مورد این خانواده ژنی را فراهم کرده و به انتخاب ژن‌های کاندید برای بررسی نقش کارکردی آن‌ها در فرآیندهای بیولوژیکی برنج با استفاده از جهش‌یافته‌های سرکوب شده و فرابیان شده کمک نماید.

REFERENCES

- Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, De Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E (2012) ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* 40: W597-W603.
- Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer EL (2004) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 32: D138-D141.
- Bolstad B (2005) RMAExpress. RMAExpress. html. View Article PubMed/NCBI Google Scholar
- Brown S, Clastre M, Courdavault V, O'Connor SE (2015) De novo production of the plant-derived alkaloid strictosidine in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (11): 3205-3210.
- Cao J, Li M, Chen J, Liu P, Li Z (2016) Effects of MeJA on Arabidopsis metabolome under endogenous JA deficiency. *Sci. Rep.* 6: 37674.
- Chaw SM, Chang CC, Chen HL, Li WH (2003) Dating the Monocot-Dicot Divergence and the Origin of Core

- Eudicots Using Whole Chloroplast Genomes. *J. Mol. Evol.* 58(4): 424-441.
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 61: 651-679.
- Dobritsa AA, Nishikawa SI, Preuss D, Urbanczyk-Wochniak E, Sumner LW, Hammond A, Carlson AL, Swanson RJ (2009) LAP3, a novel plant protein required for pollen development, is essential for proper exine formation. *Sex. Plant Reprod.* 22 (3): 167-177.
- Dong CJ, Shang QM. (2013). Genome-wide characterization of phenylalanine ammonia-lyase gene family in watermelon (*Citrullus lanatus*). *Planta.* 238(1): 35-49.
- Dutta A, Sen J, Deswal R (2013) New evidences about strictosidine synthase (Str) regulation by salinity, cold stress and nitric oxide in *Catharanthus roseus*. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 22(1): 124-131.
- Fabbri M, Delp G, Schmidt O, Theopold U (2000) Animal and plant members of a gene family with similarity to alkaloid-synthesizing enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271(1): 191-196.
- Facchini PJ (2001) Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annu. Rev. Plant Biol.* 52 (1): 29-66
- Facchini PJ, Bird DA, St-Pierre B (2004) Can Arabidopsis make complex alkaloids? *Trends Plant Sci.* 9(3): 116-122.
- Felsenstein J (1985) Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution.* 39 (4): 783-791.
- Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J (2014) Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res.* 42: D222-230.
- Finn RD, Clements J, Eddy SR (2011) HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res.* 39: W29-W37.
- Fujita M, Horiuchi Y, Ueda Y, Mizuta Y, Kubo T, Yano K, Yamaki S, Tsuda K, Nagata T, Niihama M (2010) Rice expression atlas in reproductive development. *Plant Cell Physiol.* 51 (12): 2060-2081.
- Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.* 40: D1178-D1186.
- Guo J, Wu J, Ji Q, Wang C, Luo L, Yuan Y, Wang Y, Wang J (2008) Genome-wide analysis of heat shock transcription factor families in rice and Arabidopsis. *J. Genet. Genomics.* 35 (2): 105-118.
- Hanada K, Zou C, Lehti-Shiu MD, Shinozaki K, Shiu S-H (2008) Importance of lineage-specific expansion of plant tandem duplicates in the adaptive response to environmental stimuli. *Plant Physiol.* 148 (2): 993-1003.
- Hicks MA, Barber AE, Giddings LA, Caldwell J, O'Connor SE, Babbitt PC (2011) The evolution of function in strictosidine synthase-like proteins. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* 79 (11): 3082-3098.
- Hu B, Jin J, Guo A-Y, Zhang H, Luo J, Gao G (2014) GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics.* 31 (8): 1296-1297.
- Huang W, Xian Z, Kang X, Tang N, Li Z (2015) Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of GRAS gene family in tomato. *BMC Plant Biol.* 15 (1): 209.
- Ibraheem O, Botha CE, Bradley G (2010) In silico analysis of cis-acting regulatory elements in 5' regulatory regions of sucrose transporter gene families in rice (*Oryza sativa*

- Japonica) and *Arabidopsis thaliana*. *Comput. Biol. Chem.* 34 (5): 268-283.
- Kibble NA, Sohani MM, Shirley N, Byrt C, Roessner U, Bacic A, Schmidt O, Schultz CJ (2009) Phylogenetic analysis and functional characterisation of strictosidine synthase-like genes in *Arabidopsis thaliana*. *Funct. Plant Biol.* 36 (12): 1098-1109.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7): 1870-1874.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown N, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23(21): 2947-2948.
- Lee T-H, Tang H, Wang X, Paterson AH (2013) PGDD: a database of gene and genome duplication in plants. *Nucleic Acids Res.* 41: D1152-D1158.
- Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P, 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 Res.* 30: 325-327.
- Liu T, Zeng J, Xia K, Fan T, Li Y, Wang Y, Xu X, Zhang M (2012) Evolutionary expansion and functional diversification of oligopeptide transporter gene family in rice. *Rice.* 5(1): 12.
- Liu Z, Zhang M, Kong L, Lv Y, Zou M, Lu G, Cao J, Yu X (2014) Genome-Wide Identification, Phylogeny, Duplication, and Expression Analyses of Two-Component System Genes in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *DNA Res.* 21(4): 379-396.
- Ma X, Panjekar S, Koepke J, Loris E, Stöckigt J (2006) The structure of *Rauvolfia serpentina* strictosidine synthase is a novel six-bladed β -propeller fold in plant proteins. *The Plant Cell.* 18 (4): 907-920.
- Magadum S, Banerjee U, Murugan P, Gangapur D, Ravikesavan R (2013) Gene duplication as a major force in evolution. *J. Genet.* 92 (1): 155-161.
- Memelink J, Gantet P (2007) Transcription factors involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Phytochem. Rev.* 6: 353-362.
- Menke FL, Champion A, Kijne JW, Memelink J (1999) A novel jasmonate-and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate-and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *The EMBO Journal.* 18(16): 4455-4463.
- Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* 140 (2): 411-432.
- O'Connor SE, Maresh JJ (2006) Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 23(4): 532-547.
- Pan Q, Mustafa NR, Tang K, Choi YH, Verpoorte R (2016) Monoterpenoid indole alkaloids biosynthesis and its regulation in *Catharanthus roseus*: a literature review from genes to metabolites *Phytochem. Rev.* 15(2): 221-250.
- Pandey A, Misra P, Alok A, Kaur N, Sharma S, Lakhwani D, Asif MH, Tiwari S, Trivedi PK (2016) Genome-Wide Identification and Expression Analysis of Homeodomain Leucine Zipper Subfamily IV (HDZ IV) Gene Family from *Musa accuminata*. *Front Plant Sci.* 7: 20.
- Pasquali G, Goddijn OJ, de Waal A, Verpoorte R, Schilperoort RA, Hoge JHC, Memelink J (1992) Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus*

- roseus by auxin and elicitors. *Plant Mol. Biol.* 18 (6): 1121-1131.
- Paterson AH, Bowers JE, Bruggmann R, Dubchak I, Grimwood J, Gundlach H, Haberer G, Hellsten U, Mitros T, Poliakov A (2009) The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature*. 457 (7229): 551-556.
- Schmidt O, Söderhäll K, Theopold U, Faye I (2010) Role of adhesion in arthropod immune recognition. *Annu. Rev. Entomol.* 55: 485-504.
- Sharp PA (1981) Speculations on RNA splicing (minireview). *Cell*. 23(643): 621.
- Singh AK, Kumar R, Tripathi AK, Gupta BK, Pareek A, Singla-Pareek SL (2015) Genome-wide investigation and expression analysis of Sodium/Calcium exchanger gene family in rice and *Arabidopsis*. *Rice*. 8(1): 21.
- Singh AK, Sharma V, Pal AK, Acharya V, Ahuja PS (2013) Genome-wide organization and expression profiling of the NAC transcription factor family in potato (*Solanum tuberosum* L.). *DNA Res.* 20 (4): 403-423.
- Sohani M, Schenk P, Schultz CJ, Schmidt O (2009) Phylogenetic and transcriptional analysis of a strictosidine synthase-like gene family in *Arabidopsis thaliana* reveals involvement in plant defence responses. *Plant Biol.* 11(1): 105-117.
- Stöckigt J, Barleben L, Panjekar S, Loris EA (2008) 3D-Structure and function of strictosidine synthase—the key enzyme of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Plant Physiol. Biochem.* 46 (3): 340-355.
- Theopold U, Samakovlis C, Erdjument-Bromage H, Dillon N, Axelsson B, Schmidt O, Tempst P, Hultmark D (1996) Helix pomatia lectin, an inducer of *Drosophila* immune response, binds to hemomucin, a novel surface mucin. *J. Biol. Chem.* 271 (22): 12708-12715.
- Wei K-F, Chen J, Chen Y-F, Wu L-J, Xie D-X (2012) Molecular phylogenetic and expression analysis of the complete WRKY transcription factor family in maize. *DNA Res.* 19(2):153-164.
- Xu G, Guo C, Shan H, Kong H (2011) Divergence of duplicate genes in exon-intron structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(4): 1187–1192.
- Yoshida S, Ito M, Nishida I, Watanabe A (2001) Isolation and RNA gel blot analysis of genes that could serve as potential molecular markers for leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 42(2): 170-178.
- Yu CS, Chen YC, Lu CH, Hwang JK (2006) Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* 64(3): 643-651.
- Zhang Y, Gao M, Singer SD, Fei Z, Wang H, Wang X. (2012) Genome-Wide Identification and Analysis of the *TIFY* Gene Family in Grape. *PLoS One.* 7(9): e44465.