Summer (2024) 13(46): 59-73.
DOI: 10.30473/cb.2024.70852.1962
Received: 16, Mar. 2024 Accepted: 18, May 2024

Crop Biotechnology Open Access

ORIGINAL ARTICLE

Structure and similarity of dehydrin proteins using bioinformatics tools in monocotyledons and dicotyledons plants

Armin Saed-Moucheshi, Ali Shirkhani*

Crop and Horticulture Reseach Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center (AREEO), Kermanshah, Iran.

Correspondence
Ali Shirkhani
Email: Ali.shirkhani@gmail.com

How to cite
Saed-Moucheshi, A., & Shirkhani, A. (2024). Structure and similarity of dehydrin proteins using bioinformatics tools in monocotyledons and dicotyledons. *Crop Biotechnology, 13*(46), 59-73.

ABSTRACT

Dehydrin (DHN) proteins are a group of proteins that effectively respond to abiotic stresses such as cold and drought stress in plants. These proteins are a subset of protective greater group of proteins called type II Late embryogenesis abundant which are protecting other proteins from stresses shock. Due to the significant effect of dehydrin proteins in plants, specialy under abiotic stresses, the aims of this study were to survey the linear structure along with phylogeny relationship of this proteins' group in different plants species. The protein linear sequences of different plant species were downloaded from NCBI site and then were aligned using MegaX software. The results of aligning showed highly conserved segments within the considered sequences such as K- and S-segments that are respectively responsible for covering other proteins and protecting them from damaging effects of stresses and transporting dehydrin proteins from cytoplasm to nucleus. Using the sequences' alignment, phylogenic tree was extracted using Neighbor joining method. Furthermore, linear sequence order of amino acids and their ratio in the structure of these protein were evaluated. Folowing that, the composition of these proteins genomic sequences were considered to compare with the results of amino acids evaluation. The results indicated that dicotyledon and monocotyledon plants can be clearly separated into two distinguished classes based on the amino acid structure of DHN proteins. Similarly, The ratio and order of DNHs linear sequences were distinctly altered between mono- and di-cotyledon plants. Evaluation of genomic base pairs of these proteins showed that there are numerous unchanged motifs with eighter no or a little difference shared among the genomic sequences of DHN proteins.

KEYWORDS

DNH genomic sequences, K-segment, S-segment, Late embryogenesis abundant proteins, Neighbor Joining.

© 2024, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

سال سیزدهم، شماره چهارم، پیاپی چهل و ششم، تابستان ۱۴۰۳ (۷۳-۵۹)
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۲۹
DOI: 10.30473/cb.2024.70852.1962

نشریه علمی
زیست‌فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

بررسی ساختار و قرابت پروتئین‌های دهیدرین توسط ابزارهای بیوانفورماتیک در گیاهان تک‌لپه و دولپه

آرمین ساعدموچشی، علی شیرخانی*

بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران.

نویسنده مسئول:
علی شیرخانی
رایانامه: Ali.shirkhani@gmail.com

چکیده

پروتئین‌های گروه دهیدرین (Dehydrin: DHN)، گروهی از پروتئین‌های مهم دخیل در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی مانند سرما و خشکی در گیاهان هستند. این پروتئین‌ها به گروهی از پروتئین‌های محافظت‌کننده از سایر پروتئین‌ها به نام type II Late embryogenesis abundant تعلق دارند. با توجه به اهمیت پروتئین‌های گروه دهیدرین در گیاهان، در این تحقیق روابط تکاملی این گروه در گیاهان مختلف موردبررسی قرار گرفت. بدین منظور توالی‌های پروتئین‌های دهیدرین گیاهان مختلف از سایت NCBI استخراج و هم‌ردیف گردید. نتایج وجود نواحی حفاظت‌شده ازجمله موتیف K و S که به ترتیب در واکنش با دیگر پروتئین‌های تحت تنش و محافظت از آن‌ها و همچنین انتقال پروتئین‌های گروه دهیدرین از سیتوپلاسم به هسته نقش دارند را در بین ژن‌های مورد بررسی نشان داد. درخت فیلوژنی بر پایه نواحی حفاظت‌شده و با روش Neighbor Joining رسم گردید و توالی خطی و درصد اسیدآمینه‌های موجود در ساختار این پروتئین‌ها به‌همراه توالی مکمل ژنومی آن‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پروتئین‌های گروه دهیدرین دولپه‌ای و تک‌لپه‌ای‌ها به دو گروه مجزا تفکیک‌شده و در هر گروه نیز بر اساس نزدیکی و دوری جنس‌های مختلف گیاهی در کلاسترهای مجزا قرار گرفتند. همچنین گیاهان تک و دولپه ازلحاظ توالی خطی اسیدآمینه و درصد آن‌ها هم اختلاف بالایی را نشان دادند. از طرفی، بررسی توالی ژنومی این گیاهان نشان‌دهنده وجود ساختارهای حفاظت‌شده و مشابه بود.

واژه‌های کلیدی

تنش غیر زیستی، موتیف‌های S و K، پروتئین‌های Late embryogenesis abundant، Neighbor Joining.

استناد به این مقاله:
ساعدموچشی، آرمین و شیرخانی، علی (۱۴۰۳). بررسی ساختار و قرابت پروتئین‌های دهیدرین توسط ابزارهای بیوانفورماتیک در گیاهان تک‌لپه و دولپه. فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۳(۴۶)، ۷۳-۵۹.

مقدمه

فیلوژنی یا تبار شناختی به بررسی و تعیین روابط خویشاوندی تاکسون‌ها، خطوط اجدادی و منشأ پیدایش گیاهان می‌پردازد. در فیلوژنی علاوه بر صفات ریخت شناختی از داده‌های مولکولی مثل توالی DNA موجود در هسته، کلروپلاست و یا میتوکندری استفاده می‌شود. امروزه سعی می‌شود جهت بررسی روابط تکاملی و فیلوژنی به‌جای اطلاعات ریخت‌شناسی، از اطلاعات حاصل از توالی DNA و پروتئین‌ها استفاده شود. هر نوکلئوتید یا اسیدآمینه می‌تواند به‌عنوان یک ویژگی جهت بررسی روابط فیلوژنی در نظر گرفته شود. در مقایسه با اطلاعات ریخت‌شناسی، امتیاز دادن به این نوع اطلاعات ژنتیکی هم ساده‌تر است و هم اطلاعات بیش تری در اختیار قرار می‌دهند (Sheikh Asadi *et al*., 2019). تنوع در جایابی پروتئین‌های درون سلول می‌تواند منجر به ایجاد یک عملکرد جدید و یا تفکیک عملکرد گردد و نقش مهمی در تکامل ژنوم‌های یوکاریوتی داشته‌باشد. تشخیص جایابی یک پروتئین در اجزای درون‌سلولی عملکرد بیولوژیکی آن آنزیم را تا حدود زیادی مشخص می‌کند و بینش مناسبی از مسیر تکاملی خانواده ژنی گیاهان را فراهم می‌کند (Farah Yachash *et al*., 2019).

پروتئین‌های گروه دهیدرین (Dehydrin: DHN)، گروهی از پروتئین‌های مهم هستند که در پاسخ به تنش غیر زیستی مانند تنش سرمایی و تنش خشکی در گیاهان تولید می‌گردند. این پروتئین‌ها جزء گروهی از پروتئین‌های محافظت‌کننده از سایر پروتئین‌ها هستند که به گروه Late embryogenesis typeII abundant (Lea) تعلق دارند (Yang *et al*., 2012). دهیدرین پروتئین‌های آب‌دوست بوده و در برابر حرارت مقاوم‌اند. این پروتئین‌ها دارای گلایسین و سایر آمینواسیدهای قطبی بوده و معمولاً یک کپی از توالی توافقی ۱۵ آمینواسیدی را دارند که غنی از آمینواسید لایزین بوده (EKKGIMDKIKEKPLG) و تا حدود زیادی در گونه‌های گیاهی حفاظت‌شده است (Chang-Cai Liu, 2012). از سال ۱۹۸۹ که برای اولین بار این پروتئین‌ها در جو و ذرت مشاهده گردید، به‌عنوان پایه ژنتیکی مقاومت به خشکی شناخته می‌شود (Close *et al*., 1989).

برای شناسایی قطعی نحوه عمل این پروتئین‌ها، آزمایشی با روش خاموش‌سازی ژنی که ارتباط مستقیم با عملکرد پروتئین های دهیدرین داشت انجام گرفت و مشخص گردید که گیاهان شاهد می‌توانند بعد از تنش شوری (که باعث ایجاد تنش اسموتیک می‌شود) و پس‌ازآن بازیابی از تنش تا ۹۴ درصد وزن‌تر معمول را بازیابی کنند درحالی‌که گیاهان جهش داده‌شده تنها تا ۳۴ درصد وزن‌تر معمول خود را بازیابی کردند (Saavedra *et al*., 2006). همچنین در یک آزمایش دیگر مشاهده گردید که میزان بیان پروتئین‌های دهیدرین در گیاهان مختلف مقاوم به خشکی در مقایسه با گیاهان غیر مقاوم به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (Velasco-Conde *et al*., 2012). مکانیسم عمل این گروه از پروتئین‌ها هنوز به‌طور کامل شناسایی نشده است ولی چنین به نظر می‌رسد که یک رابطه مستقیم بین هورمون آبسیزیک اسید به عنوان یک سیگنال در پاسخ به تنش‌های محیطی و تولید دهیدرین در گیاهان وجود دارد به‌طوری‌که این هورمون باعث افزایش تولید این گروه از پروتئین‌ها می‌گردد که شاهدی جهت تایید کارکرد دهیدرین‌ها در شرایط تنش است (Borovskii *et al*., 2002).

سان و همکاران اعلام نمودند که در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی (مانند خشک‌سالی، تنش اسمزی، شوری و دما)، بسیاری از ژن‌های DHN در تمام بافت‌های رویشی تنظیم می‌شوند. Smith and Graether (۲۰۲۲) نیز معتقدند که بیان افزایشی یک پروتئین[1] LEA عموماً در پاسخ به حداقل یکی از سه تنش غیر زیستی، خشکی، سرما و استرس اسمزی رخ می‌دهد که همگی منجر به تخلیه آب درون‌سلولی می‌شوند و LEA حتی در بافت رویشی خشک‌شده نیز بیان می‌شود. این امر در مورد همه موجودات موجود در قلمرو گیاهی، از جمله گیاهان غیر آوندی نیز صادق است. بااین‌حال، جلبک‌های سبز پروتئین‌های LEA کمتری در ژنوم خود دارند، افزون بر این، اسید آبسیزیک (ABA)، هورمونی که در بلوغ جنین‌ها نقش دارد، در تنظیم مثبت برخی از پروتئین‌های LEA نقش دارد (Smith & Graether, 2022). ژنوم‌های گیاهی اغلب چندین خانواده پروتئین LEA را رمزگذاری می‌کنند که لزوماً در پاسخ به تنش‌های یکسان تنظیم نمی‌شوند و می‌توانند برای مراحل خاصی از رشد منحصربه‌فرد باشند (Lan *et al*., 2013) رابطه تکاملی بین ساختارهای مختلف گروه پروتئین‌های دهیدرین تا به امروز به‌طور کامل مشخص نشده است. انجام این کار به‌دلیل تعداد متغیر موتیف‌های حفاظت‌شده دشوار است، بنابراین دستیابی به هم‌ترازی‌های دقیق توالی چندگانه لازم برای مطالعات فیلوژنتیک را بسیار چالش برانگیز می‌کند. بااین‌حال، چندین مطالعه در حال حاضر موجود است که ژنوم گیاهان مختلف (برنج، گندم، کیوی، لوکو، سیب زمینی) را با هدف شناسایی دهیدرین ها و ترسیم شجره

1. Protein expression

فیلوژنتیک به‌منظور درک بهتر تکامل آن‌ها در آن گیاه مورد تجزیه‌وتحلیل قرار داده‌اند. اغلب این مطالعات نشان دهنده اثر مهم جهش مضاعف و داخل شدن قطعه یا تکه‌های تکراری ژنومی مشابه به دورن ژن‌های دهیدرین به‌عنوان عامل اصلی در تنوع بخشیدن به پروتئین‌های این خانواده هستند. همچنین یک مطالعه دیگر که روی تک گونه گیاهی از خانواده Pinaceae تمرکز داشته است موفق به شناسایی قطعه ایی ژنومی به نام N1 شد که در درحال‌حاضر نام آن به قطعه F تغییر یافته‌است (Liu *et al.*, 2012; Verma *et al.*, 2017; Zan, Li, Li, Zhang, & Li, 2020; Zhang *et al.*, 2021). در یکی از جامع‌ترین مطالعات خانواده‌محور در گیاهان که روی خانواده Pinaceae متمرکز بود، نویسندگان بخشی از ژنوم در آن زمان به نام N1 نام گذاری شد را شناسایی کردند که اکنون این بخش به‌عنوان بخش F شناخته می‌شود. نتایج تجزیه‌وتحلیل فیلوژنتیک در این پژوهش نشان داد که دهیدرین‌های Pinaceae به دو گروه تقسیم می شوند، در گروه دوم، دهیدرین‌های FKn و Kn هرکدام به دو کلاد تقسیم می‌شوند که نشان‌دهنده از دست دادن موازی موتیف های توالی است (Stival Sena *et al.*, 2018).

دهیدرین‌ها در بافت‌های مختلف گیاهان در پاسخ به تنش‌های محیطی گوناگون از جمله خشکی، یخزدگی، شوری و حتی فلزات سنگین همراه با افزایش سنتز آبسزیک‌اسید سنتز می‌شوند (Hanin *et al.*, 2011). برخی از انواع پروتئین‌های دهیدرین نقش حفاظتی مهمی در پاسخ گیاهان به تنش خشکی دارند (Tripepi *et al.*, 2011). گیاهان می‌توانند از طریق ژن‌هایی مانند دهیدرین در برابر خشکی مقاومت نشان دهند. این ژن در برابر تنش‌های خشکی، شوری و سرما واکنش نشان‌می‌دهد (Battaglia *et al.*, 2008). این پروتئین‌ها ضمن محافظت سلول در برابر تنش خشکی، مانع واسرشته شدن ماکرو مولکول‌ها شده و سبب حفظ ساختار غشای سلولی می‌شوند (Sun *et al.*, 2009). سنتز و انباشت دهیدرین‌ها نه‌تنها در پاسخ به تنش، بلکه به‌عنوان بخشی از وقایع از پیش برنامه‌ریزی‌شده در طی مراحل نهایی تکوینی دانه در گیاهان روی می‌دهد (Jiménez-Bremont *et al.*, 2013). آن‌ها ظرفیت هیدراتاسیون بالایی از خود نشان می دهند و همچنین می‌توانند مقادیر زیادی کاتیون را متصل کنند، آب را در سلول‌های خشک‌کننده نگه‌دارند و از عدم تعادل یونی و دناتوره شدن پروتئین جلوگیری کنند (Decena *et al.*, 2021). بیشترین محل حضور ژن دهیدرین درون‌هسته، سیتوپلاسم و اندامک‌هایی مثل کلروپلاست و میتوکندری است (Velasco-Conde *et al.*, 2012). در حالت عادی، دهیدرین درون اندامک سیتوپلاسم و کلروپلاست فعالیتی ندارد، اما افزایش بیان آن تحت شرایط خاص درون اندامک سیتوپلاسم و کلروپلاست رخ می‌دهد. در برخی منابع مکانیسم مقاومت به خشکی پروتئین‌های Lea بدین شکل تشریح شده‌است که در شرایط دهیدراتاسیون به صورت سازه‌های پروتئینی متشکل از مارپیچ آلفا شروع به نفوذ در ساختمان غشاء سلولی می‌نمایند. پس از ورود این پروتئین‌ها در ساختمان غشاء وضعیت ترمودینامیکی غشاء در اثر کنار هم قرار گرفتن ساختارهای آب‌گریز غشاء که ناشی از برهم‌کنش‌های گروه های آب‌دوست و آب‌گریز غشاء است، تغییر می‌نماید. این بدان معنی است که ساختار مارپیچ آلفای پروتئین دهیدرین در تعامل با لایه‌های فسفولیپیدی قرار می‌گیرد و ضخامت غشاء سلولی را افزایش می‌دهد و باعث مقاومت سلول به تنش خشکی و پدیده دهیدراتاسیون می‌شود (Yousef Zaei *et al.*, 2019).

ازآنجاکه مطالعات بسیار محدودی در رابطه با ساختار و روابط این گروه از پروتئین‌ها در گیاهان صورت گرفته‌شده و از طرفی این پروتئین‌ها دارای اهمیت بالایی در گیاهان هستند، مطالعه حاضر سعی در بررسی ساختار و روابط تکاملی و همچنین ارزیابی قرابت پروتئین‌های گروه دهیدرین در گیاهان تک‌لپه و دولپه را دارد.

مواد و روش‌ها

توالی مربوط به نوکلئوتیدی و پروتئین‌های خانواده دهیدرین (DHN1) در آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) دانلود گردید و پس‌ازآن توالی‌های گروه دهیدرین بر اساس شباهت با ژن دهیدرین آرابیدوپسیس (Danyluk, Houde, Rassart, & Sarhan, 1994) و با استفاده از بلاست پروتئیناز سایت NCBI استخراج گردید. همه توالی‌های دارای شباهت با توالی‌های دهیدرین آرابیدوپسیس، تک‌تک در سایت NCBI چک شد و در صورتی که هرکدام از توالی‌های مربوط به گروه دیگر یا دارای عملکردی غیر مرتبط با این گروه بودند حذف گردید. همچنین، مرحله آخر جهت انتخاب توالی‌های اندازه‌گیری میزان شباهت آن ها با توالی دهیدرین آرابیدوپسیس بود که بر این اساس توالی‌ها مجدد در سایت NCBI بلاست گردید و توالی‌های دارای شباهت بیشتر از ۴۰ درصد انتخاب شدند. برای بررسی روابط تکاملی و فیلوژنی توالی‌های منتخب الاینمنت آن‌ها با استفاده از روش ClustalW و با الگوریتم ماتریس وزنی BLUSOM و نیز روش

MUSCLE با الگوریتم UPGMA در نرم‌افزار MEGA11 انجام شد. چون تعداد توالی‌های مشابه با روش MUSCLE بیشتر بود و توانایی بیشتری برای تشخیص شباهت توالی را نشان داد، درنهایت از روش MUSCLE و الگوریتم UPGMA جهت بررسی فیلوژنی این توالی‌ها استفاده گردید. در زمان الاینمنت کردن توالی‌ها، توالی‌هایی که دارای طول‌های کوتاه بودند و یا همولوژی پایینی را ازلحاظ موتیفی با سایر پروتئین‌ها دارا بودند حذف شده و مجدداً الاینمنت برای توالی‌های باقی‌مانده برای تعیین روابط فیلوژنتیکی انجام گرفت. رسم نهایی درخت فیلوژنی با استفاده از توالی پروتئین‌های انتخابی با روش Neighbor Joining و با Bootstrap هزار در نرم‌افزار MEGA11 (جهت نصب این نرم‌افزار می‌توان به سایت https://www.megasoftware.net مراجعه نموده و بر اساس نوع سیستم‌عامل فایل نصب نرم‌افزار را دانلود کرد) انجام گردید. توالی‌های آمینواسیدی و درصد ترکیبات آن‌ها در پروتئین‌های گروه دهیدرین برای هرگونه گیاهی با استفاده از نرم‌افزار مگا انجام شد و درنهایت از این نسبت‌های آمینواسیدی جهت گروه بندی روابط تکاملی گونه‌های مورد بررسی استفاده گردید. از نرم افزار R جهت استخراج همبستگی و پلات همبستگی بین گونه‌ها و آمینواسیدها استفاده گردید. همچنین کلاسترینگ و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز با استفاده از پکیج‌های مربوط به نرم‌افزار R استفاده شد.

نتایج و بحث

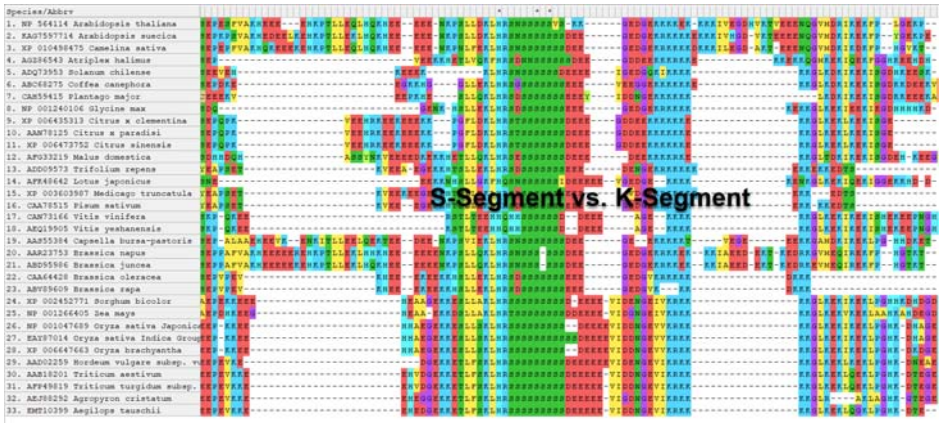
جهت بررسی ساختار و کارکرد پروتئین‌های دهیدرین در گیاهان مختلف در این مطالعه از تعداد ۱۰۰ توالی پروتئینی مربوط به پروتئین های گروه دهیدرین یافت شده در NCBI، توالی مربوط به تعداد ۳۳ گونه گیاهی که دارای بالاترین شباهت به ژن دهیدرین گندم بودند انتخاب و برای تعیین روابط فیلوژنی مورداستفاده قرار گرفتند. نتایج وجود چندین نواحی حفاظت‌شده بین توالی‌های انتخابی را نشان داد (شکل) که این نواحی برای عملکرد ژن در گیاهان حائز اهمیت می باشد. یکی از این نواحی حفاظت‌شده مربوط به قطعه K است که دارای ۱۵ اسیدآمینه غنی از لایزین می‌باشد. هنگامی‌که تنش پسابی (Dehydration) اتفاق می‌افتد، این موتیف باعث ایجاد یک آلفا-هلیکس در پروتئین می‌شود که شباهت بسیاری به آلفا-هلیکس موجود در قسمت A2 آپولیپو پروتئین دارد و نقش آن واکنش با پروتئین‌هایی است که تحت تنش پسابی قرار گرفته‌اند و این پروتئین ها در برمی‌گیرد تا از تخریب به‌وسیله تنش محافظت شوند (Hanin *et al.*, 2011). یکی دیگر از موتیف‌های مهم و کارکردی در دهیدرین‌ها موتیف S است که می‌تواند به‌وسیله کاسین کاینز ۲ (*casein kinase* II;CK2) دچار تغییرات پس از ترجمه‌ای مانند فسفوریلاسیون شود که این تغییرات در انتقال آن‌ها از سیتوپلاسم به هسته سلول نقش ایفا می‌کند. بااین‌حال وجود پروتئین‌های دهیدرینی که فاقد موتیف S هستند نیز در داخل هسته سلول گزارش گردیده است (Hanin *et al.*, 2011). چنین به نظر می‌رسد که این نواحی حفاظت‌شده وظیفه اصلی و کارکردی این پروتئین‌ها در واکنش به تنش را بر عهده‌دارند به‌طوری‌که در طی تکامل به‌طور حفاظت‌شده باقیمانده‌اند. در شکل ۲ می‌توان نزدیکی فاصله خطی دو ناحیه K و S در ترکیبات اسیدآمینه گیاهان مختلف و همچنین تفاوت ساختاری آن‌ها را مشاهده نمود.

روابط فیلوژنی و رسم درخت تکاملی مرتبط با پروتئین‌های دهیدرین در شکل ۳ نشان داده‌شده‌است. نتایج نشان‌می‌دهد که گیاهان دولپه و تک‌لپه قادرند بر اساس فاصله ژنتیکی محاسبه شده از ماتریکس‌های ژنتیکی به‌خوبی از هم جدا گردند. جهت نمایش ساختاری فاصله ژنتیکی بین گیاهان دولپه و تک‌لپه شکل ۴ با تقسیم‌بندی این دو گروه بر اساس توالی اسیدآمینه مربوط به پروتئین‌های خانواده دهیدرین به نمایش درآمده‌است. فیلوژنی و گروه‌بندی ساختاری گیاهان بر اساس این گروه از پروتئین‌ها نشان‌دهنده شباهت بیشتر نواحی پروتئینی توالی گیاهان موجود در یک جنس نسبت به سایر جنس‌ها را به وضوح نشان‌می‌دهد (شکل ۳ و شکل ۴).

بیشترین شباهت در تک‌لپه‌ای‌ها مربوط به گندم نان و گندم دوروم است که می‌توان آن را در بررسی طول خطهای نشان دهنده فاصله ژنتیکی در درخت فیلوژنی موردبررسی در شکل ۳ مشاهده نمود؛ بنابراین چنین به نظر می‌رسد که توالی پروتئین های دهیدرین در گندم نان و دوروم تا مدت‌زمانی طولانی تحت فشار تکاملی یکسانی قرار داشته‌اند. آژیلوپس نیز که از اجداد گندم است به‌همراه آگروپایرون بافاصله کمی در گروه مشابه گندم نان و دوروم قرار گرفته و بعد از آن جو با فاصله بیشتری نسبت به این گروه قرار گرفته است. شباهت سورگوم و ذرت نیز بالا بوده و در کنار هم در یک گروه قرار گرفته‌اند. گونه‌های مختلف برنج و براکیپودیوم نیز با فاصله از آن‌ها در یک زیرگروه دیگر قرار گرفتند و درنهایت زیرگروه‌های تک‌لپه‌ای با هم‌پیوند خورده و به‌صورت واضحی از دولپه‌ای‌ها متمایز گردیدند.

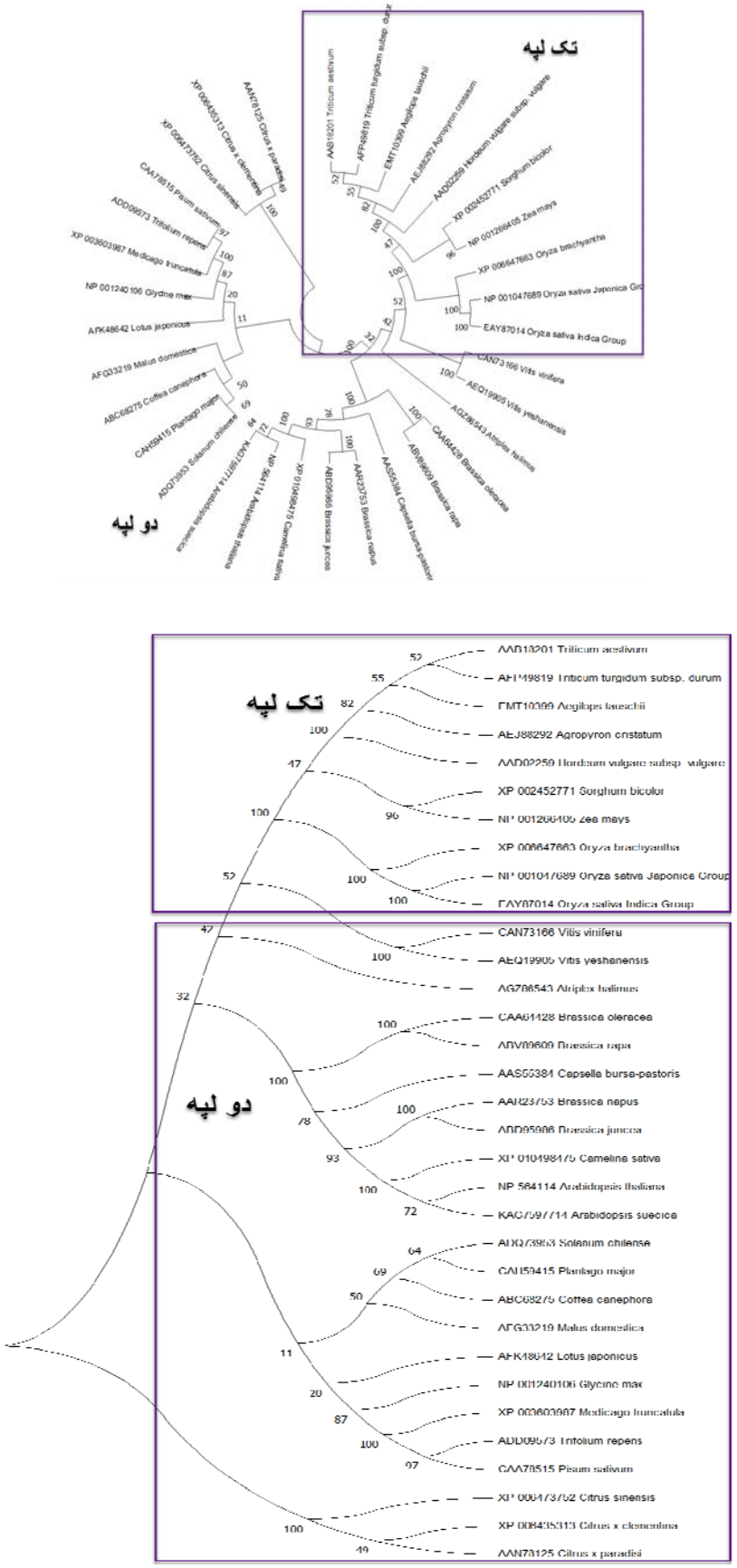
شکل ۱. قسمت‌های حفاظت‌شده در توالی‌های دهیدرین گیاهان موردبررسی

Figure 1. Preserved segments of dehydrin protein sequences in evaluated plant species



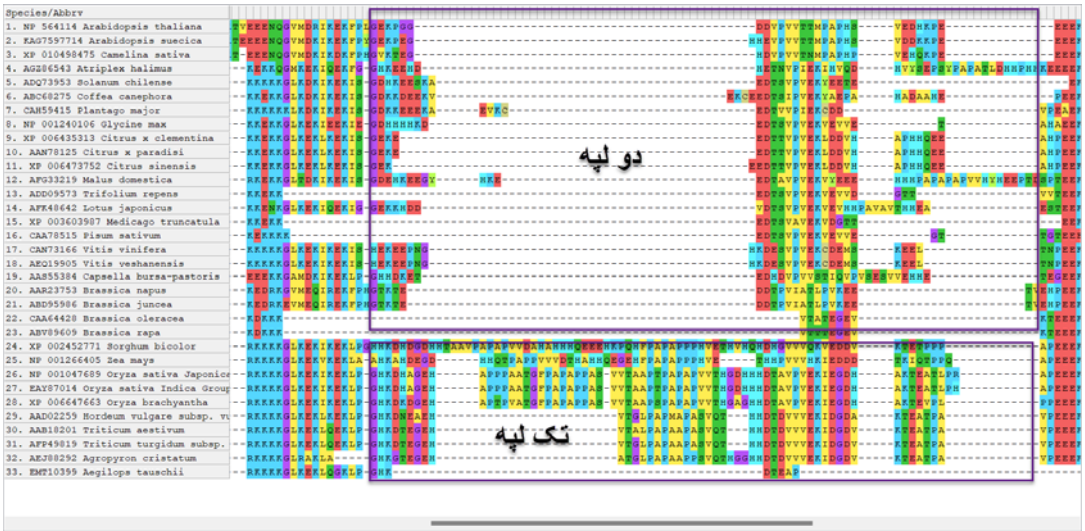
شکل ۲. قسمت‌های محافظت‌شده K و S جهت مقایسه آن‌ها

Figure 2. Preserved K and S segments of dehydrin protein sequences



شکل ۳. درخت فیلوژنی مربوط به توالی پروتئین‌های گروه دهیدرین بر پایه روش Neighbor Joining در نرم‌افزار MEGA11

Figure 3. Phylogenic tree of dehydrin proteins based on Neighbor Joining method using Mega 11 software



شکل ۴. بخش‌های متفاوت در توالی مربوط به گروه پروتئین خانواده دهیدرین بین گیاهان تک‌لپه و دولپه

Figure 4. Unpreserved segments of dehydrin protein family regarding monocotyledon and dicotyledon plants

در گروه دولپه‌ای‌ها نیز مانند تک‌لپه‌ای‌ها، زیرگروه‌هایی از جنس‌های مختلف brassicaceae، fabaceae، rosacea، solanaceae و plantaginaceae به وضوح متمایز گردیدند. در این میان یک پروتئین از گونه گیاه سویا از جنس فاباسه تا حدودی دورافتاده و دارای شباهت بیشتری با جنس پلتناژناسه و سولاناسه بود که نشان‌دهنده شباهت عملکردی این پروتئین در این گیاه با این دو جنس است. جهت مشاهده تفاوت، شباهت و همچنین درصد و نوع اسیدآمینه‌های تشکیل‌دهنده پروتئین‌های دهیدرین در گیاهان موردبررسی و تشخیص کیفی فاصله ژنتیکی گیاهان مختلف در ارتباط با ساختار اسیدآمینه‌های ساختاری این پروتئین‌ها، جدول ۱ که نشان‌دهنده نوع اسیدآمینه‌های موجود در ساختار پروتئین‌های دهیدرین در گیاهان موردبررسی و همچنین درصد تشکیل‌دهنده هرکدام از این اسیدآمینه در توالی و ساختار پروتئینی آورده شده‌است. به‌دلیل اینکه این نسبت‌ها قابل‌درک گردد و معیاری برای مقایسه مناسب‌تر ساختار پروتئین‌های دهیدرین در گیاهان موردبررسی، نتایج و داده‌های موجود در جدول ۱ که شامل نوع و درصد اسیدآمینه‌های ساختاری در این پروتئین‌ها است به ماتریس ناهمسانی ژنتیکی (Genetics Dissimilarity) یا به‌اصطلاح فاصله ژنتیکی (Genetic Distance) بین گونه‌ها تبدیل گردید که در جدول ۲ آورده شده است. در این جدول نتایج مقایسه دوبه‌دو و جفتی همه گونه‌های گیاهی بر پایه اسیدآمینه‌ها نشان داده‌شده و می‌توان میزان شباهت یا تفاوت بین همه جفت گونه‌ها را به آسانی با هم مقایسه نمود. نتایج جدول ۲ نیز با استفاده از روش جدید پلات همبستگی تبدیل به یک گراف با ساختار ساده گردید (شکل ۵). در این شکل مشاهده می‌گردد که به‌صورت کلی گیاهان موردبررسی دارای شباهت‌های ساختاری قابل‌مشاهده هستند، بااین‌حال در این شکل مجزا بودن دو گروه دولپه و تک‌لپه بر اساس پلات همبستگی رسم شده بر پایه توالی اسیدآمینه‌های پروتئین دهیدرین در گیاهان مختلف محرز و قابل‌شناسایی است. علاوه بر آن، شکل ۶ که نشان‌دهنده کلاستر بندی گونه‌های گیاهی موردبررسی در این مطالعه است به‌صورت کاملاً واضح قادر به تفکیک دو گروه گیاهان تک‌لپه و دولپه بود. همچنین فاصله ژنتیکی بین گونه‌های مختلف داخل هر گروه گیاهی و تک‌لپه و دولپه و شباهت ساختاری پروتئین‌های آن‌ها در شکل ۶ قابل‌تشخیص است.

به‌صورت کلی ۱۹ نوع اسیدآمینه در ساختار پروتئین‌های گیاهی در این مطالعه مشاهده گردید. اسیدآمینه تریپتوفان در هیچ کدام از پروتئین دهیدرین مربوط به گونه‌های گیاهی موردبررسی مشاهده نگردید. همچنین، اسیدآمینه سیستئین تنها در چهار گونه گیاهی *Coffea canephora* (۱/۸ درصد)، *Plantago major* (۳/۱ درصد)، *Vitis vinifera* (۱/۲ درصد) و *Vitis yeshanensis* (۱/۲ درصد) مشاهده گردید (جدول ۱). از بین این چهار گونه گیاهی دو گونه *Coffea canephora* و *Plantago major* با شباهت بالا در داخل یک کلاستر و دو گونه دیگر شامل *Plantago major* و *Vitis vinifera* نیز در یک کلاستر قرار گرفتند (شکل ۶) که نشان‌دهنده شباهت ساختاری این گونه‌های موردبحث ازلحاظ ساختار خطی اسیدآمینه، درصد تشکیل این اسیدآمینه‌ها و همچنین عملکرد آن‌ها است.

جدول ۱. درصد آمینواسیدهای تشکیل‌دهنده توالی‌های مربوط به ژن‌های دهیدرین در گیاهان مختلف

Table 1. Ration (Percent) of each amino acid in the linear structure of dehydrin protein of different plant species

گونه گیاهی	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His	Ile	Lys	Leu	Met	Asn	Pro	Gln	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr	تعداد جهت باز
Arabidopsis thaliana	3.47	0	5.02	18.92	2.7	5.02	4.25	3.09	16.99	4.63	2.32	1.93	7.34	2.7	1.16	6.56	6.56	6.56	0	0.77	259
Arabidopsis suecica	3.11	0	4.67	19.84	2.33	4.67	5.06	2.33	17.9	5.06	2.33	2.33	7.39	1.95	1.17	7.39	5.84	5.45	0	1.17	257
Camelina sativa	3.92	0	3.92	20	2.75	4.31	5.1	2.75	17.25	4.71	2.35	3.53	7.45	3.14	1.18	5.49	6.67	4.71	0	0.78	255
Atriplex halimus	4.72	0	9.44	15.45	2.58	6.01	7.73	3	17.6	2.58	2.15	2.58	5.15	1.72	1.72	6.44	3	6.01	0	2.15	233
Solanum chilense	5.53	0	5.03	21.11	2.01	7.04	4.02	4.02	18.59	4.02	0.5	1.51	5.53	1.51	1.01	9.05	3.02	5.03	0	1.51	199
Coffea canephora	7.93	1.76	5.73	19.82	1.76	8.81	2.64	3.08	20.26	4.41	0.44	0.88	5.29	1.76	1.32	6.17	2.64	3.96	0	1.32	227
Plantago major	5.68	3.06	5.68	21.4	2.18	4.8	1.75	3.49	18.78	4.37	0.44	0.87	7.42	1.75	0.87	4.8	5.24	5.68	0	1.75	229
Glycine max	4.67	0	5.61	20.09	1.87	7.01	6.54	2.8	17.76	4.67	0.47	0.93	5.14	2.34	1.4	7.48	4.67	5.61	0	0.93	214
Citrus x clementina	5.56	0	5.98	20.09	1.71	5.56	5.98	2.14	19.23	5.13	0.85	0.43	6.84	3.85	1.28	6.41	3.42	4.7	0	0.85	234
Citrus x paradisi	5.13	0	5.98	20.09	1.71	5.56	5.98	2.14	19.23	5.13	0.85	0.43	7.26	3.85	1.28	6.41	3.42	4.7	0	0.85	234
Citrus sinensis	5.13	0	5.98	20.51	1.71	5.13	5.98	2.14	19.23	5.13	0.85	0.43	7.26	3.85	1.28	6.41	3.42	4.7	0	0.85	234
Malus domestica	5.42	0	7.22	20.22	1.44	5.78	6.86	2.53	16.61	3.61	0.36	1.08	6.14	2.17	1.44	7.22	3.61	4.33	0	3.97	277
Trifolium repens	2.76	0	7.37	16.59	1.84	5.07	5.07	3.23	17.05	3.69	0.46	1.84	5.07	1.38	1.38	7.83	11.52	6.45	0	1.38	217
Lotus japonicus	3.86	0	6.87	17.6	2.15	7.73	5.15	3.43	16.31	4.72	0.43	3.86	3.86	3.86	0.43	6.87	6.01	6.44	0	0.43	233
Medicago truncatula	4.78	0	8.61	15.31	1.91	5.26	5.74	2.87	16.75	3.83	0.48	②會	4.78	1.91	1.44	6.7	11	5.26	0	1.44	209
Pisum sativum	5.09	0	5.56	18.52	1.85	7.41	5.56	2.78	16.2	4.17	0.46	1.39	4.17	0.93	1.39	6.48	11.11	5.56	0	1.39	216
Vitis vinifera	3.61	1.2	6.63	19.28	0.6	5.42	6.63	2.41	20.48	4.82	1.81	1.81	6.63	3.01	0.6	7.83	3.61	3.61	0	0	166
Vitis yeshanensis	3.61	1.2	6.63	19.28	0.6	5.42	6.63	2.41	21.08	4.82	1.81	1.81	6.63	3.01	0	7.83	3.61	3.61	0	0	166
Capsella bursa-pastoris	3.83	0	4.6	21.07	1.15	4.21	4.6	3.45	14.56	4.21	1.53	2.68	6.51	1.92	1.15	7.66	9.2	7.28	0	0.38	261
Brassica napus	5.17	0	4.43	22.88	2.21	4.43	4.8	1.85	15.87	5.54	1.48	1.48	6.27	1.85	2.58	6.27	7.01	5.17	0	0.74	271
Brassica juncea	4.12	0	4.94	23.05	2.06	4.12	4.53	2.06	18.11	5.76	1.65	0.82	5.35	2.47	2.06	6.17	7.41	4.94	0	0.41	243
Brassica oleracea	5.03	0	6.03	20.6	2.01	5.53	5.03	2.01	19.1	4.52	1.01	0.5	6.53	0.5	1.51	7.54	5.53	6.53	0	0.5	199
Brassica rapa	3.65	0	5.73	20.83	2.08	5.73	5.21	2.08	18.23	4.69	1.04	0.52	6.77	0.52	1.04	7.29	6.77	7.29	0	0.52	192
Sorghum bicolor	9.89	0	7.07	14.84	0.35	7.07	9.19	2.12	13.78	5.3	1.06	0.71	8.13	3.53	1.77	5.65	2.83	6.36	0	0.35	283
Zea mays	9.96	0	8.54	12.81	0.36	7.12	7.83	2.49	12.46	5.34	1.07	1.78	8.19	4.63	2.14	5.69	3.56	5.69	0	0.36	281
Oryza sativa Japonica	11.38	0	5.52	14.48	1.03	7.93	5.86	2.07	13.1	4.83	1.03	1.03	10.69	1.03	2.07	6.9	5.17	5.52	0	0.34	290
Oryza sativa Indica	11.64	0	5.48	14.38	1.03	7.88	6.16	2.05	13.01	4.79	1.03	1.03	10.62	1.03	1.71	7.19	5.14	5.48	0	0.34	292
Oryza brachyantha	10.45	0	5.57	14.29	1.05	8.36	4.53	2.09	13.94	5.23	1.05	0.7	10.8	1.39	1.39	8.36	4.18	6.27	0	0.35	287
Hordeum vulgare	9.41	0	6.27	16.86	0.78	7.45	3.92	1.96	14.9	6.27	1.57	1.18	7.06	1.57	1.96	6.67	4.31	7.06	0	0.78	255
Triticum aestivum	10.82	0	5.97	16.04	0.75	7.46	4.48	1.87	14.18	5.97	1.12	0.75	7.09	1.87	1.49	6.34	5.22	7.84	0	0.75	268
Triticum turgidum	10.45	0	5.97	16.04	0.75	7.84	4.48	1.87	14.18	5.97	1.12	0.75	7.09	1.87	1.49	6.34	5.22	7.84	0	0.75	268
Agropyron cristatum	5.43	0	5.43	17.93	1.09	10.87	3.8	2.17	13.59	5.98	1.63	1.09	4.35	2.72	2.72	7.61	5.43	7.61	0	0.54	184
Aegilops tauschii	7.14	0	6.04	18.68	0.55	8.79	3.3	1.65	15.38	7.14	1.65	1.1	4.95	2.2	2.2	8.79	3.85	5.49	0	1.1	182
میانگین	6.37	0.19	6.03	18.3	1.54	6.39	5.32	2.48	16.49	4.89	1.16	1.38	6.82	2.24	1.47	6.85	5.41	5.76	0	0.91	237

جدول ۲. تخمین ناهمسان (dissimilarity) یا فاصله (distance) ژنتیکی گونه‌های گیاهی بر اساس ترکیب آمینواسیدهای آن‌ها

Table 2. Estimated genetic dissimilarities, or genetic distances, in the structure of dehydrin protein in different plant species based on their amino acid content

گونه گیاهی	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Arabidopsis thaliana(1)																								
Arabidopsis suecica(2)	0.00																							
Camelina sativa(3)	0.00	0.00																						
Atriplex halimus(4)	0.25	0.60	0.43																					
Solanum chilense(5)	0.00	0.00	0.00	0.72																				
Coffea canephora(6)	0.34	0.51	0.56	0.41	0.20																			
Plantago major(7)	0.00	0.00	0.00	0.46	0.00	0.03																		
Glycine max(8)	0.00	0.00	0.00	0.16	0.00	0.00	0.00																	
Citrus x clementina (9)	0.01	0.05	0.09	0.09	0.00	0.08	0.00	0.02																
Citrus x paradisi(10)	0.00	0.00	0.03	0.09	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00															
Citrus sinensis(11)	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00														
Malus domestica(12)	0.03	0.00	0.08	0.00	0.00	0.05	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00													
Trifolium repens(13)	0.00	0.00	0.07	0.28	0.59	1.07	0.55	0.49	0.67	0.57	0.60	0.47												
Lotus japonicus(14)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.26	0.72	0.39	0.00	0.10	0.12	0.17	0.13	0.08											
Medicago truncatula(15)	0.00	0.17	0.11	0.77	0.88	1.06	0.46	0.50	0.22	0.26	0.29	0.64	0.00	0.09										
Pisum sativum(16)	0.00	0.08	0.16	0.46	0.27	0.58	0.29	0.14	0.33	0.37	0.40	0.20	0.00	0.15	0.12									
Vitis vinifera(17)	0.20	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.16	0.00	0.00	0.07								
Vitis yeshanensis(18)	0.29	0.01	0.24	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.01	0.00	0.00							
Capsella bursa-pastoris(19)	0.00	0.00	0.00	0.54	0.00	0.51	0.00	0.00	0.13	0.10	0.11	0.20	0.00	0.02	0.17	0.00	0.00	0.00						
Brassica napus(20)	0.02	0.00	0.00	0.80	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.17	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00					
Brassica juncea(21)	0.19	0.03	0.09	0.71	0.00	0.30	0.00	0.00	0.15	0.09	0.08	0.06	0.00	0.04	0.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00				
Brassica oleracea(22)	0.00	0.19	0.26	0.26	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.21	0.10	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00			
Brassica rapa(23)	0.00	0.21	0.28	0.33	0.00	0.07	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.22	0.00	0.07	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00		
Sorghum bicolor(24)	0.67	0.72	0.78	0.25	0.57	0.27	1.29	0.41	0.01	0.00	0.00	0.24	1.02	0.57	0.85	1.04	0.00	0.00	0.81	0.52	0.69	0.54	0.69	
Zea mays(25)	1.04	1.20	1.07	0.48	0.80	0.47	1.72	0.81	0.54	0.67	0.65	0.77	1.10	0.82	0.67	1.18	0.29	0.36	1.22	1.14	1.37	1.14	1.26	0.00

شاخص نابرابری در هر سایت برای همه جفت توالی‌های مورداستفاده نشان داده‌شده‌است. مقادیر بیشتر از مقدار عددی صفر (۰) نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی بالا در ارتباط با ترکیب پایه آمینواسیدی نسبت به بر اساس واگرایی تکاملی بین توالی‌ها است.

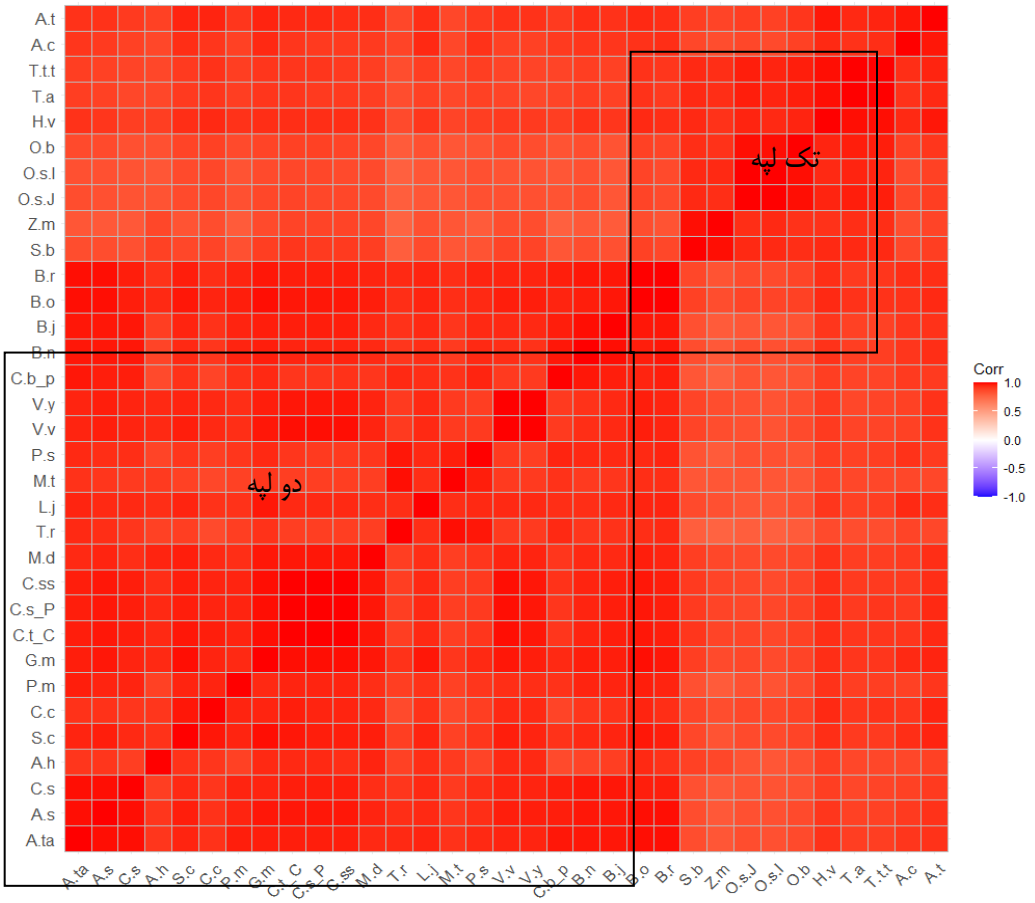
ادامه جدول ۲. تخمین ناهمسان یا فاصله ژنتیکی گونه‌های گیاهی بر اساس ترکیب آمینواسیدهای گروه پروتئین دهیدرین در این گیاهان

Continued table 2. Estimated genetic dissimilarities, or genetic distances, in the structure of dehydrin protein in different plant species based on their amino acid content

گونه گیاهی	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	26	27	28	29	30	31	32
Oryza sativa Japonica(26)	0.18	0.14	0.29	0.17	0.11	0.12	0.81	0.05	0.00	0.03	0.07	0.11	0.56	0.29	0.69	0.40	0.00	0.00	0.44
Oryza sativa Indica(27)	0.24	0.20	0.32	0.15	0.11	0.17	0.84	0.07	0.00	0.03	0.08	0.14	0.56	0.33	0.69	0.40	0.00	0.00	0.49
Oryza brachyantha(28)	0.05	0.05	0.26	0.29	0.05	0.21	0.71	0.11	0.00	0.00	0.00	0.21	0.63	0.27	0.72	0.66	0.00	0.00	0.34
Hordeum vulgare(29)	0.26	0.25	0.38	0.14	0.00	0.00	0.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.56	0.14	0.53	0.40	0.00	0.01	0.43
Triticum aestivum(30)	0.35	0.35	0.48	0.17	0.23	0.00	0.70	0.06	0.05	0.08	0.11	0.23	0.58	0.11	0.52	0.40	0.00	0.02	0.44
Triticum turgidum(31)	0.35	0.35	0.48	0.17	0.23	0.00	0.70	0.06	0.05	0.08	0.11	0.23	0.58	0.11	0.52	0.40	0.00	0.02	0.44
Agropyron cristatum(32)	0.00	0.02	0.12	0.15	0.20	0.10	0.42	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.07	0.01	0.00	0.03	0.11	0.10
Aegilops tauschii(33)	0.12	0.04	0.21	0.22	0.00	0.00	0.43	0.03	0.00	0.00	0.00	0.04	0.46	0.02	0.40	0.20	0.01	0.08	0.18

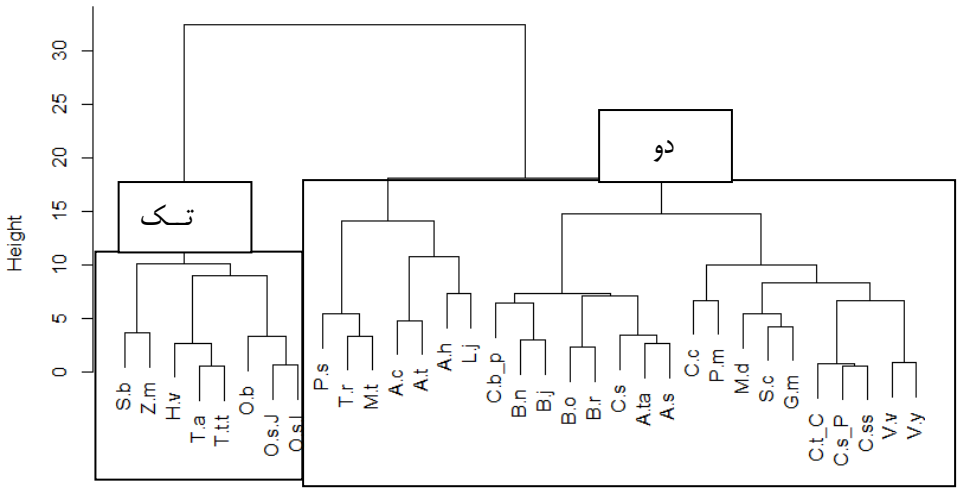
گونه گیاهی	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	31	32
Oryza sativa Japonica(26)	0.15	0.27	0.07	0.08	0.04	0.20							
Oryza sativa Indica(27)	0.17	0.30	0.09	0.08	0.03	0.19	0.00						
Oryza brachyantha(28)	0.15	0.23	0.06	0.09	0.15	0.33	0.02	0.05					
Hordeum vulgare(29)	0.12	0.18	0.03	0.06	0.09	0.24	0.00	0.00	0.00				
Triticum aestivum(30)	0.17	0.26	0.09	0.09	0.04	0.18	0.00	0.00	0.05	0.00			
Triticum turgidum(31)	0.17	0.26	0.09	0.09	0.05	0.20	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00		
Agropyron cristatum(32)	0.01	0.00	0.03	0.00	0.11	0.15	0.00	0.00	0.00	0.08	0.02	0.01	
Aegilops tauschii(33)	0.00	0.03	0.04	0.01	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02

شاخص نابرابری در هر سایت برای همه جفت توالی‌های مورداستفاده نشان داده‌شده‌است. مقادیر بیشتر از ۰ نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی بالا در ارتباط با ترکیب پایه آمینواسیدی نسبت به بر اساس واگرایی تکاملی بین توالی‌ها است.



شکل ۵. پلات همبستگی بین گونه‌های گیاهی موردبررسی بر اساس ترکیب آمینواسیدی مربوط به توالی پروتئین‌های خاموده دهیدرین

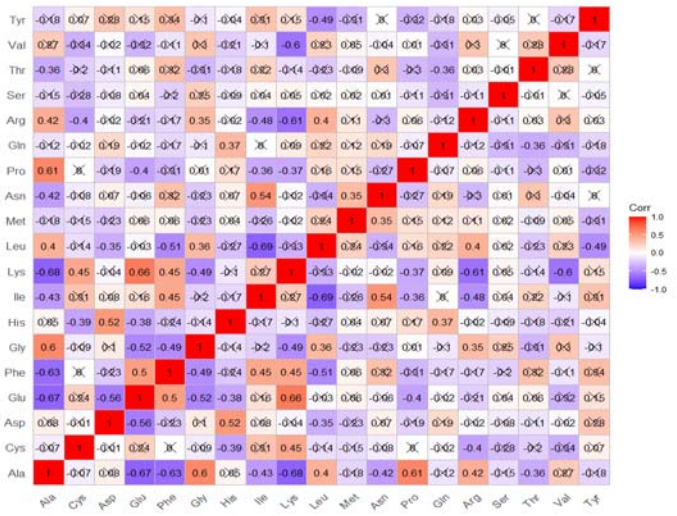
Figure 5. Correlation plot of evaluated plant species based on their amino acid sequences regarding dehydrin proteins



شکل ۶. کلاسترینگ مربوط به گونه‌های گیاهی موردبررسی بر اساس ترکیب و درصد آمینواسیدی در ارتباط با خانواده پروتئین‌های دهیدرین

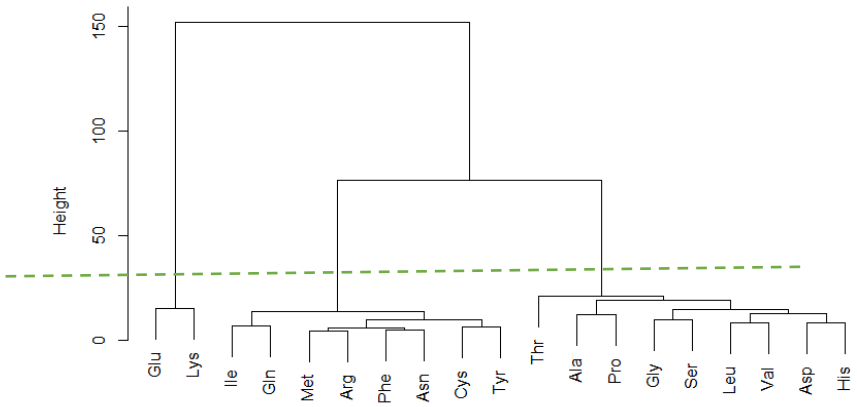
Figure 6. Clustering analysis of the evaluated plant species based on their amino acid sequences regarding dehydrin proteins

بر اساس ترکیب اسیدآمینه‌های موجود در ساختار پروتئین‌های دهیدرین، مقدار همبستگی بین این پروتئین‌ها محاسبه گردید و با استفاده از نرم‌افزار R به پلات همبستگی تبدیل گردید (شکل ۷). جهت بررسی بیشتر ترکیبات اسیدآمینه‌ای و مطالعه تفاوت بین این اسیدآمینه‌ها، کلاستر بین آن‌ها ترسیم گردید و که در شکل ۸ ارائه گردیده‌است. اسیدآمینه‌های تایروزین، والین، تراونین و سرین با هیچ کدام از اسیدآمینه‌های موجود همبستگی معنی‌داری نشان ندادند که نشان‌دهنده تنوع بین گیاهان موردبررسی در ارتباط با مقدار این اسیدآمینه‌ها در ساختار آن‌هاست. بیشترین مقدار همبستگی ازلحاظ عددی بین ۰/۶ و ۰/۷ قرار داشت که بیشترین مقدار آن (۰/۶۹-) در همبستگی بین لوسین و ایزولوسین بود که ازلحاظ ساختاری نیز دارای مشابهت بسیار با هم هستند. آلانین با اسیدآمینه‌های گلوتامین (۰/۶۷-)، فنیل‌آلانین (۰/۶۳-)، گلایسین (۰/۶)، ایزولوسین (۰/۴۳-)، لایزین (۰/۶۸-)، لوسین (۰/۴)، آسپاراژین (۰/۴۲-) و پرولین (۰/۶۱) دارای همبستگی معنی‌دار بود. اسیدآمینه سیستئین با هیستئین (۰/۳۹-)، لایسن (۰/۴۵) و آرژنین (۰/۴-) دارای همبستگی معنی‌دار بود. تنها اسیدآمینه‌هایی که با آسپاراژین همبستگی معنی‌دار نشان دادند اسیدآمینه گلوتامین (۰/۵۶-) و هیستئین (۰/۵۶) بود. اسیدآمینه های گلوتامین و فنیل‌آلانین دارای همبستگی مثبت و معنی‌دار (۰/۵) بودند و این دو اسیدآمینه نیز دارای همبستگی منفی معنی‌دار با آلانین، منفی و معنی‌دار با گلایسین و مثبت و معنی‌دار با لایسین بودند. بر اساس شباهت و فاصله اقلیدسی بین اسیدآمینه‌ها موجود در ساختار پروتئین‌های دهیدرین در گیاهان موردمطالعه، تجزیه کلاستر نشان‌دهنده تفکیک روشن کلیه اسیدآمینه‌ها به سه گروه مجزا بود. گروه اولی شامل دو اسیدآمینه گلوتامین و لایسین بود، گروه دو شامل ایزولوسین، میتیونین، آرژنین، فنیل‌آلانین، آسپاراژین، سیستئین و فایروزین در گروه دوم و سایر اسیدآمینه‌های موجود در ساختار پروتئین‌های دهیدرین نیز در گروه سوم قرار گرفتند. بررسی ساختار رابطه‌ای و توزیع اسیدآمینه‌ها در گیاهان مختلف به‌وسیله گراف هیت‌مپ و بای‌پلات در شکل ۹ و شکل ۱۰ آورده شده‌است. در گراف هیت‌مپ، سلول‌های دارای رنگ قرمز تیره با عدد کوچک‌تر ازلحاظ علامتی (منفی‌تر) نشان‌دهنده ارتباط پایین تر است و به این معنی است که گیاه موردنظر دارای مقدار پایین تری از آن اسیدآمینه است. سلول‌هایی که دارای عدد بزرگ‌تر و به‌اصطلاح مثبت‌تر هستند نشان‌دهنده ارتباط بالای بین اسیدآمینه موردنظر و گیاه مرتبط با آن سلول است که به معنی بالا بودن مقدار این اسیدآمینه در گیاه موردبررسی است. این نتایج مرتبط با ارتباط مقابل بین گونه‌های گیاهی و اسیدآمینه‌های تشکیل‌دهنده گروه دهیدرین به‌همراه نتایج مربوط به گروه‌بندی گیاهان و خود اسیدآمینه‌ها به‌صورت مجزا به‌وسیله گراف بای‌پلات مورد تایید قرار گرفت (شکل ۹ و ۱۰). در این گراف گیاهان تک‌لپه در یک گوشه از گراف قرار گرفتند و سایر گیاهان دولپه در قسمت‌های دیگر پلات پخش شدند. بیشترین مقدار اسیدهای آمینه در گیاهان تک‌لپه مربوط به اسیدآمینه‌های آلانین و گلایسین بود که بیشترین نزدیکی را با این گروه گیاهی داشتند. همچنین، فلش‌های جهت‌دار این گراف که مربوط به هر اسیدآمینه است در صورت نزدیکی به هر گیاه نشان‌دهنده مقدار بالاتر از این اسیدآمینه در گیاه موردنظر است.



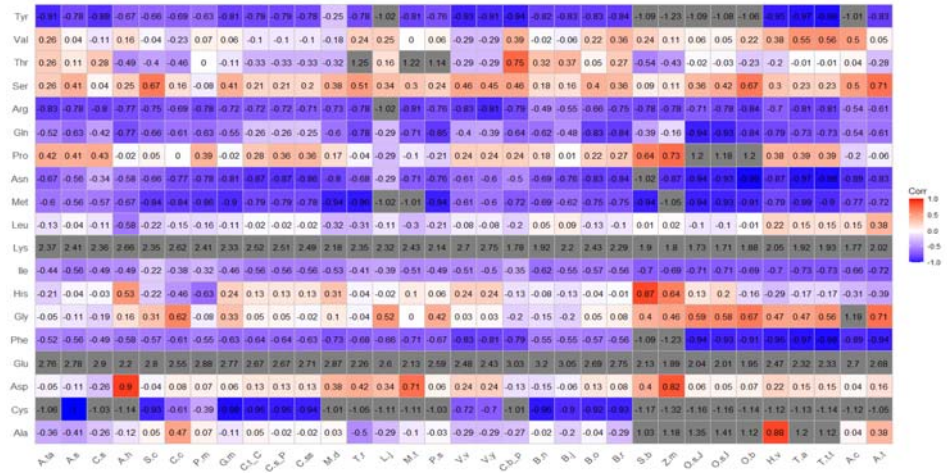
شکل ۷. پلات همبستگی بین آمینواسیدهای موجود در توالی ژنی دهیدرین در گونه‌های موردبررسی

Figure 7. Correlation plot of the amino acids in the protein structure of dehydrin family belonging to the evaluated plant species



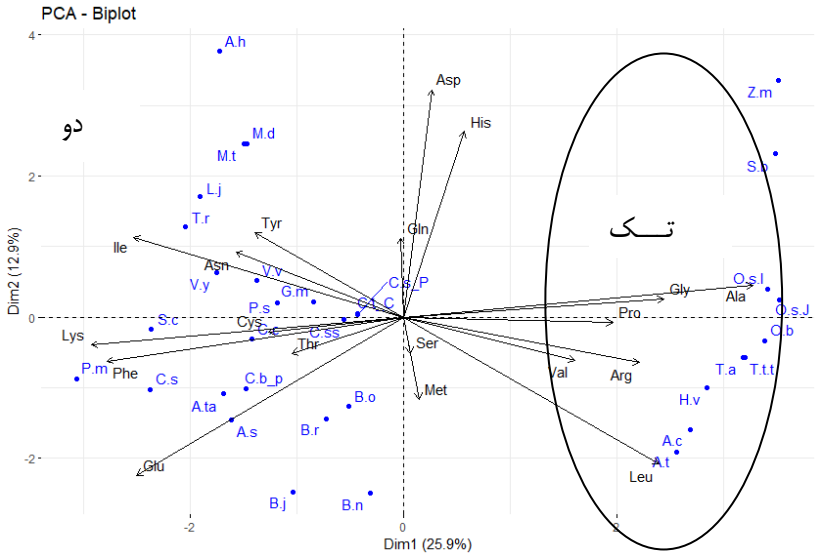
شکل ۸. کلاسترینگ مربوط به ترکیبات اسیدآمینه موجود در گونه‌های گیاهی مورد بررسی بر اساس خانواده پروتئین‌های دهیدرین

Figure 8. Clustering of the amino acids in the protein structure of dehydrin family belonging to the evaluated plant species



شکل ۹. هیت مپ (Heatmap) مربوط به ترکیبات اسیدآمینه خانواده پروتئین‌های دهیدرین (ردیف‌ها) و گونه‌های گیاهی مورد بررسی (ستون‌ها) جهت بررسی روابط آنها

Figure 9. Heatmap of the amino acids composition in the protein structure of dehydrin family belonging to the evaluated plant species



شکل ۱۰. بای‌پلات (Biplot) مربوط به ترکیبات اسیدآمینه پروتئین‌های گروه دهیدرین و گونه‌های گیاهی مورد بررسی به‌صورت هم‌زمان

Figure 10. Biplot of the amino acid composition along with the evaluated plant species at the same time

Saavedra *et al.* (۲۰۰۶) جهت تشخیص نحوه عمل پروتئین‌های خانواده دهیدرین آزمایشی را با استفاده از روش خاموش‌سازی ژنی (Gene Knockout) طراحی کردند که نتایج این پژوهش نشان‌دهنده ارتباط مستقیم عملکردی پروتئین‌های دهیدرین با شرایط پس از تنش شوری و اسموتیک بود. در این آزمایش گیاهان شاهد پس از بازیابی از تنش قادر بودند تا میزان ۹۴ درصد از رشد خود را بازیابی کنند، درحالی‌که گیاهان جهش داده‌شده و بدون ژن‌های مربوط به خانواده پروتئین‌های دهیدرین تنها تا ۳۴ درصد قادر به بازیابی بودند. همچنین در آزمایش Velasco-Conde *et al.* (2012) مقدار بیان ژن‌های مربوط به پروتئین‌های خانواده دهیدرین در گیاهان مورد آزمایش که دارای مقاومت بالایی به شرایط تنش خشکی بودند به‌صورت معنی‌داری از گیاهان شاهد حساس به خشکی بالاتر بود. هرچند عملکرد دقیق و مقدار کارایی این گروه از پروتئین‌ها هنوز به‌خوبی و به‌طور کامل شناسایی نشده است، این مطالعات نشان‌دهنده اهمیت این گروه از پروتئین‌ها در مقاومت و تحمل گیاهان به شرایط تنش های محیطی است که اهمیت اجرای پروژه‌های تحقیقاتی را روی مکانیسم عمل و استفاده از آن‌ها جهت تولید گیاهان مقاوم به تنش‌های محیطی را مشخص می‌سازد. نتایج پژوهش Borovskii *et al.* (۲۰۰۲) نیز تأییدکننده یک ارتباط مستقیم بین میزان تولید و غلظت پروتئین‌های دهیدرین در سلول‌های گیاهی و هورمون آبسیزیک اسید بود که این هورمون به‌عنوان یک سیگنالینگ سلولی در گیاهان و در پاسخ به تنش‌های محیطی عمل می‌کند و این نتایج نیز تأییدکننده عملکرد مهم این پروتئین‌ها در شرایط نامساعد و تنش در گیاهان است.

بر اساس مطالعات انجام‌شده، پروتئین‌های گروه دهیدرین در گیاهان را بر اساس چندین موتیف حفاظت‌شده می‌توان به چند زیرگروه، مانندYnSKn ، YnKn، SKn، Kn و KnS تقسیم کرد. در این مطالعه نیز ساختارهای K، S و Y در پروتئین‌های مربوط به گیاهان موردبررسی کاملاً قابل‌مشاهده و تفکیک بود. بخش K که دارای یک دامنه تکراری غنی از لیزین (EKKGIMDKIKEKLPG) است، یک موتیف حفاظت‌شده انحصاری است که در تمام DHNها وجود دارد و این بخش ممکن است نقش محوری در تعاملات پروتئین لیپیدی داشته‌باشد (Koag *et al.*, 2009). دهیدرین‌ها نقش مهمی در طیف وسیعی از تنش‌های غیر زیستی در گیاهان ایفا می‌کنند. بااین‌حال، نقش تکاملی DHNها به‌صورت کامل کشف نشده است (Sun *et al.*, 2021). مطالعات تکاملی دهیدرین‌های اسپرماتوفیت، KnیاSKnرا به‌عنوان قدیمی‌ترین ساختارهای اجدادی شناسایی کردند، درحالی‌که توالی‌های دارای بخش Y تنها در گیاهان گل‌دار قابل‌مشاهده بود (Decena *et al.*, 2021). تکامل گیاهی منجر به تعداد و ساختارهای متنوع دهیدرین‌ها در گونه‌های مختلف گیاهی شده‌است. از ۳۵ گونه آنژیوسپرم بررسی‌شده توسط (Malik *et al.*, 2017)، همه آن‌ها حداقل یک SKn دهیدرین

داشتند. ۳۹ گونه حاوی حداقل یک دهیدرینYnSKn ، ۱۳ گونه حاوی حداقل یک دهیدرین YnKn و ۱۵ گونه حاوی حداقل یک دهیدرین Kn بودند.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان‌دهنده اهمیت بالای پروتئین‌های خانواده دهیدرین در تحمل شرایط تنش در گیاهان است. بررسی توالی اسیدآمینه‌های ساختاری و درصد آن‌ها به‌همراه بررسی خطی توالی ژنومی ژن‌های مربوطه نشان‌دهنده تفاوت‌های قابل‌مشاهده و معنی‌دار بین دو گروه گیاهان دولپه‌ای و تک‌لپه‌ای بود. از طرفی گیاهان داخل هر یک از این گروه نیز دارای تفاوت‌ها و شباهت های ژنتیکی مرتبط با درصد و نحوه قرارگیری اسیدهای آمینه داشتند. اسیدآمینه‌های آلانین، گلایسین و پرولین از جمله اسیدآمینه‌هایی بودند که دارای نزدیکی هندسی در تحلیل مؤلفه های اصلی بودند و نشان‌دهنده اهمیت بالای این اسیدآمینه‌ها در ساختار این گیاهان بود. چندین ناحیه حفاظت‌شده در بین پروتئین‌های موردبررسی شناسایی شد که نشان‌دهنده اهمیت این نواحی برای عملکرد ژن‌های دهیدرین است.

References

Borovskii, G. B., Stupnikova, I. V., Antipina, A. I., Vladimirova, S. V., & Voinikov, V. K. (2002). Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BMC Plant Biology, 2*, 1-7 .

Decena, M. A., Gálvez-Rojas, S., Agostini, F., Sancho, R., Contreras-Moreira, B., Des Marais, D. L., Hernandez, P., & Catalán, P. (2021). Comparative genomics, evolution, and drought-induced expression of dehydrin genes in model Brachypodium grasses. *Plants, 10*(12), 2664-2681 .

Koag, M.-C., Wilkens, S., Fenton, R. D., Resnik, J., Vo, E., & Close, T. J. (2009). The K-segment of maize DHN1 mediates binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes. *Plant physiology, 150*(3), 1503-1 .٥١٤

Malik, A. A., Veltri, M., Boddington, K. F., Singh, K. K., & Graether, S. P. (2017). Genome analysis of conserved dehydrin motifs in vascular plants. *Frontiers in plant science, 8*, 252-268 .

Saavedra, L., Svensson, J., Carballo, V., Izmendi, D., Welin, B., & Vidal, S. (2006). A dehydrin gene in Physcomitrella patens is required for salt and osmotic stress tolerance. *The Plant Journal, 45*(2), 237-249 .

Sun, Y., Liu, L., Sun, S., Han, W., Irfan, M., Zhang, X., Zhang, L., & Chen, L. (2021). AnDHN, a dehydrin protein from Ammopiptanthus nanus, mitigates the negative effects of drought stress in plants. *Frontiers in plant science, 12*, 788-838 .

Velasco-Conde, T., Yakovlev, I., Majada, J. P., Aranda, I., & Johnsen, Ø. (2012). Dehydrins in maritime pine (Pinus pinaster) and their expression related to drought stress response. *Tree genetics & genomes, 8*, 957-973 .

Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garciarrubio, A., Campos, F., & Covarrubias, A. A. (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant physiology, 148*(1), 6-24 .

Borovskii, G. B., Stupnikova, I. V., Antipina, A. I., Vladimirova, S. V & ,.Voinikov, V. K. (2002). Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BMC Plant Biology, 2*, 1-7 .

Close, T. J., Kortt, A. A., & Chandler, P. M. (1989). A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant molecular biology, 13*, 95-108 .

Danyluk, J., Houde, M., Rassart, É., & Sarhan, F. (1994). Differential expression of a gene encoding an acidic dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerant gramineae species. *FEBS letters, 344*(1), 20-24 .

Decena, M. A., Gálvez-Rojas, S., Agostini, F., Sancho, R., Contreras-Moreira, B., Des Marais, D. L., Hernandez, P., & Catalán, P. (2021). Comparative genomics, evolution, and drought-induced expression of dehydrin genes in model Brachypodium grasses. *Plants, 10*(12), 2664-2681 .

Farah Yachash, S., Nazeri, S., & Mino Chehar, Z. (2019). In silico investigation of the process of molecular evolution and expansion of the geranyl geranyl diphosphate synthase protein family in plants. *Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Biology Journal), 33*(3), 326-342 .

Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y., Takeda, S., & Masmoudi, K. (2011). Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. *Plant signaling & behavior, 6*(10), 1503-1509 .

Jiménez-Bremont, J. F., Maruri-López, I., Ochoa-Alfaro, A. E., Delgado-Sánchez, P., Bravo, J., & Rodríguez-Kessler, M. (2013). LEA gene introns: is the intron of dehydrin genes a characteristic of the serine-segment? *Plant Molecular Biology Reporter, 31*, 128-140 .

Lan, T., Gao, J., & Zeng, Q.-Y. (2013). Genome-wide analysis of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in Populus trichocarpa. *Tree genetics & genomes, 9*, 253-264.

Liu, C.-C., Li, C.-M., Liu, B.-G., Ge, S.-J., Dong, X.-M., Li, W., Zhu, H.-Y., Wang, B.-C., & Yang, C.-P. (2012). Genome-wide identification and characterization of a dehydrin gene family in poplar (*Populus trichocarpa*). *Plant Molecular Biology Reporter, 30*, 848-859 .

Saavedra, L., Svensson, J., Carballo, V., Izmendi, D., Welin, B., & Vidal, S. (2006). A dehydrin gene in Physcomitrella patens is required for salt and osmotic stress tolerance. *The Plant Journal, 45*(2), 237-249 .

Sheikh Asadi, M ,.Naderi, R., Kafi, M., Fatahi Moghadam, M., & Eslami, A. (2019). Study of molecular phylogeny and structure of matk protein in *Lilium ledebourii* [Baker] Boiss. *Journal of plant production research, 27*(4), 181-191 .

Smith, M. A., & Graether, S. P. (2022). The disordered dehydrin and its role in plant protection: A biochemical perspective. *Biomolecules, 12*(2), 294-307 .

Stival Sena, J., Giguère, I., Rigault, P., Bousquet, J., & Mackay, J. (2018). Expansion of the dehydrin gene family in the Pinaceae is associated with considerable structural diversity and drought-responsive expression. *Tree Physiology, 38*(3), 442-456 .

Sun, X., Xi, D. H., Feng, H., Du, J. B., Lei, T., Liang, H. G., & Lin, H. H. (2009). The dual effects of salicylic acid on dehydrin accumulation in water-stressed barley seedlings. *Russian journal of plant physiology, 56*, 348-354 .

Sun, Y., Liu, L., Sun, S., Han, W., Irfan, M., Zhang, X., Zhang, L., & Chen, L. (2021). AnDHN, a dehydrin protein from Ammopiptanthus nanus, mitigates the negative effects of drought stress in plants. *Frontiers in plant science, 12*, 788-838 .

Tripepi, M., Pöhlschroder, M., & Beatrice Bitonti, M. (2011). Diversity of dehydrins in Oleae europaea plants exposed to stress. *The Open Plant Science Journal, 5*(1), 308-320 .

Velasco-Conde, T., Yakovlev, I., Majada, J. P., Aranda, I., & Johnsen, Q. (2012). Dehydrins in maritime pine (Pinus pinaster) and their expression related to drought stress response. *Tree genetics & genomes, 8*, 957-973 .

Verma, G., Dhar, Y. V., Srivastava, D., Kidwai, M., Chauhan, P. S., Bag, S. K., Asif, M. H., & Chakrabarty, D. (2017). Genome-wide analysis of rice dehydrin gene family: Its evolutionary conservedness and expression pattern in response to PEG induced dehydration stress. *PLoS One, 12*(5), 176-193. .

Yang, Y., He, M., Zhu, Z., Li, S., Xu, Y., Zhang, C., Singer, S. D., & Wang, Y. (2012). Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. *BMC Plant Biology, 12*, 1-17 .

Yousef Zaei, S., Mahdinjad, N., Fakheri, B., & Ganjali, P. (2019). Identification of DHN5 gene and investigation of its evolutionary relationships in cultivated wheat and its ancestors. *Modern genetics, 15*(4), 361-370 .

Zan, T., Li, L., Li, J., Zhang, L., & Li, X. (2020). Genome-wide identification and characterization of late embryogenesis abundant protein-encoding gene family in wheat: evolution and expression profiles during development and stress. *Gene, 736*, 1444-1452 .

Zhang ,J., Xia, H., Liang, D., Lin, L., Deng, H., Lv, X., Wang, Z., Wang, J., & Xiong, B. (2021). Genome-wide identification and expression profiling of the dehydrin gene family in Actinidia chinensis. *Scientia Horticulturae, 280*, 1099-1130 .