

## ORIGINAL ARTICLE

### Identification of *FAD* family genes in the genome of *Spirulina (Arthrospira platensis)* microalgae and investigation of cellular functions in response to abiotic stresses

Sahar Faraji<sup>1</sup>, Ghorbanali Nematzadeh<sup>1,2</sup>, Seyed Kamal Kazemitabar<sup>1</sup>,  
Ali Pakdin-Parizi<sup>3\*</sup>(ORCID: 0000-0003-4570-8021)

1. Department of Plant Breeding, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.
2. Department of Molecular Biology and Genetics Engineering, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.
3. Department of Citrus and Medicinal Plants, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

**Correspondence:**  
Ali Pakdin-Parizi  
Email: [a.pakdin@sanru.ac.ir](mailto:a.pakdin@sanru.ac.ir)

Received: 16, Mar. 2024  
Accepted: 21, Jun. 2024

#### How to cite:

Faraji, S., Nematzadeh, Gh., Kazemitabar, S. K., & Pakdin-Parizi, A. (2024). Identification of *FAD* family genes in the genome of *Spirulina (Arthrospira platensis)* microalgae and investigation of cellular functions in response to abiotic stresses. *Crop Biotechnology*, 14(1), 87-106.

(DOI: [10.30473/cb.2024.70853.1963](https://doi.org/10.30473/cb.2024.70853.1963))

#### ABSTRACT

*Arthrospira platensis* (*Spirulina*) is a valuable photosynthesizing prokaryote with numerous industrial and food applications. Fatty acid desaturase enzymes (FADs) are responsible for the production of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. In the present study, the genome of *A. platensis* C1 was investigated using bioinformatics methods in order to identify *ApFAD* genes family. A total of 8 *ApFAD* genes were identified in *Spirulina* genome and classified into Omega, Sphingolipid, CrtR\_beta-carotene-hydroxylase and Acyl-CoA groups. Four conserved histidine motifs that are essential for binding to the di-iron structures and catalytic activities were identified. Investigation of post-translational modifications of *ApFAD* proteins revealed a wide range of glycosylation and phosphorylation changes. Evaluation of *FAD* gene promoter regions revealed different types of *cis*-regulatory elements responsive to phytohormones and stress conditions, especially in Omega (*ApFAD-6*) and Acyl-lipid (*ApFAD-3*) desaturases. Also, protein-protein interaction networks showed the relations between *ApFADs* and genes involved in dealing with stresses through the biosynthetic process of secondary metabolites and electron transfer. Analysis of RNA-seq data of orthologous genes in *Arabidopsis* showed the potential of Omega and Acyl-lipid genes, such as *ApFAD-3*, *ApFAD-6* and *ApFAD-7*, in response to various environmental stresses. In general, the results of this study can contribute to a more complete understanding of the function of *FAD* genes in *Spirulina* and lay the basis for the transgenic study of these genes with the aim of increasing the content of unsaturated fatty acids, improving the nutritional value of oils, as well as promoting the stress tolerance of plants.

#### KEY WORDS

*Arthrospira platensis*, Bioinformatic analysis, Fatty acid desaturase, Genome analysis, Stress dealing.



# زیست‌فناوری گیاهان زراعی

سال چهاردهم، شماره یکم، پاییز ۴۷، پاییز ۱۴۰۳ (۸۷-۱۰۶)

DOI: 10.30473/cb.2024.70853.1963

«مقاله پژوهشی»

## ژن‌های خانواده FAD در گستره ژنوم ریزجلبک اسپیروولینا (Arthrosphaera platensis) و بررسی عملکردهای سلولی در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی

سحر فرجی<sup>۱</sup>، قربانعلی نعمتزاده<sup>۲\*</sup>، سید کمال کاظمی‌تبار<sup>۱</sup>، علی پاکدین‌پاریزی<sup>۳</sup> (ارکید: ۰۰۰۰۰۳۴۵۷۰۸۰۲۱)

### چکیده

ریزجلبک *Arthrosphaera platensis* یک پروکاریوت فتوسنتز کننده ارزشمند با مصارف صنعتی و غذایی متعدد می‌باشد. آنزیم‌های اسید چرب دساقوراز (FADS) مسئول تولید اسیدهای چرب غیراشیاع تک و چندگانه هستند. در مطالعه حاضر با استفاده از راهکارهای بیوانفورماتیکی، ژنوم *C1* *A. platensis* به منظور شناسایی ژن‌های خانواده *ApFAD* بررسی شد. تعداد ۸ ژن *ApFAD* در ژنوم اسپیروولینا شناسایی و به گروه‌های *Acyl-CoA*, *CrtR\_beta-carotene-hydroxylase*, *Sphingolipid*, *Omega* و *آسیل-لیپید* (4*ApFAD-3*) را نمایان ساخت. همچنین، شبکه‌های برهمنکنش پروتئین-پروتئین تعامل بین *ApFAD*ها و ژن‌های دخیل در مقابله با تنش به واسطه فرآیند بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه و نیز انتقال الکترون را نشان دادند. آنالیز داده‌های RNA-seq ژن‌های ارتو لوگ در آراییدوپسیس، پتانسیل ژن‌های گروه امگا و آسیل-لیپید در اسپیروولینا، مانند ژن‌های *ApFAD-6*, *ApFAD-7* و *ApFAD-3* را در پاسخ به تنش-های محیطی مختلف نشان داد. بطورکلی، نتایج این تحقیق می‌تواند به درک و شناخت کاملتر عملکرد ژن‌های *FAD* در اسپیروولینا کمک کرده و زمینه را برای دستورالعملی این ژن‌ها با هدف افزایش محتوای اسیدهای چرب غیراشیاع و بهبود ارزش تغذیه‌ای روغن‌ها و نیز افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی مختلف فراهم نماید.

### واژه‌های کلیدی

ارزیابی بیوانفورماتیکی، اسید چرب دساقوراز، آنالیز ژنوم، تحمل تنش، *Arthrosphaera platensis*

۱. گروه اصلاح نباتات، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

۲. گروه بیولوژی موکولی و مهندسی ژنتیک، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

۳. گروه مرکبات و گیاهان دارویی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

نویسنده مسؤول:

علی پاکدین پاریزی  
رایانه‌ام: a.pakdin@sanru.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۶  
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۰۱

استناد به این مقاله:

فرجی، سحر؛ نعمتزاده، قربانعلی؛ کاظمی‌تبار، سید کمال و پاکدین پاریزی، علی (۱۴۰۳). شناسایی ژن‌های خانواده FAD در گستره ژنوم ریزجلبک اسپیروولینا (*Arthrosphaera platensis*) و بررسی عملکردهای سلولی در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۰۶-۸۷، ۱۱۴ (۱).

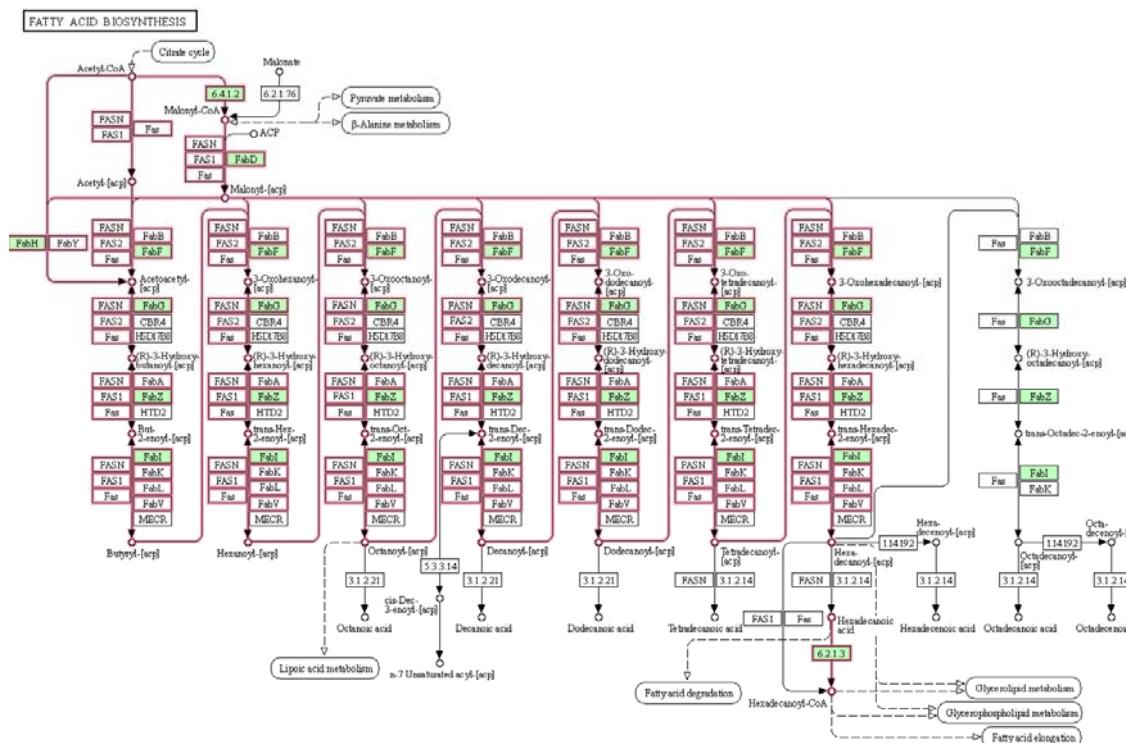
(DOI: 10.30473/cb.2024.70853.1963)

سیانوباکتری‌ها، ریزجانداران پروکاریوئی فتوستتر کننده هستند که گروه بزرگی از باکتری‌های حقیقی را تشکیل می‌دهند. این ریزجانداران از نظر مورفولوژیکی تک سلولی یا رشته‌ای بوده و به لحاظ عملکردی به دو گروه ثبیت کننده نیتروژن (هتروسیست‌دار) و غیرثبیت کننده نیتروژن تقسیم می‌شوند (*Arthrosphaera platensis*) (Hoiczyk, 2000). اسپیروولینا (Hoiczyk, 2000) یک سیانوباکتری با خصوصیات تغذیه‌ای و سلامتی بخش متعدد می‌باشد (Van Tuerenhout, 2005). این ریزجلبک یک منبع غنی پروتئین (۷۰ درصد وزن خشک) حاوی همه اسیدهای آمینه ضروری، ویتامین‌های گروه B و ویتامین C، مواد معدنی، اسیدهای چرب چندگانه غیراشباع ضروری و ترکیبات آنتی‌اسیدانی شامل کاروتونوئیدها، فیکوسیانین‌ها و کلروفیل می‌باشد. محتوای بالای ترکیبات آنتی‌اسیدانی در اسپیروولینا سبب خواص ضدالتهابی، ضدسرطانی و تقویت سیستم ایمنی می‌شود (Wan et al., 2021). اسیدهای چرب (FAs) اسیدهای چرب (FAs) (Wan et al., 2021) بلوک‌های سازنده آسیل-لیپیدها هستند که عموماً شامل لیپیدهای غشایی قطبی و چربی‌های ذخیره‌ای خنثی می‌باشند. لیپیدهای غشایی قطبی، که به عنوان مرزهای حفاظت سلولی عمل می‌کنند، نه تنها یکپارچگی بخش‌های درون سلولی را حفظ می‌کنند، بلکه در آغاز سیگنال‌های درون سلولی طی فرآیندهای مختلف رشد و مقابله با تنش‌های گوناگون نیز نقش بسیار مهمی دارند (Lu et al., 2013; Alonso et al., 2003; Díaz et al., 2018). از سوی دیگر، لیپیدهای ذخیره‌ای خنثی نیز، به عنوان گروه چربی‌های چگال انرژی‌زا، به عنوان منابع مهمی برای ذخیره کربن و انرژی هستند. میزان و کارایی غیراشباع سازی اسیدهای چرب، که با عملکرد اسید چرب دساقورازها (FADs) تعیین می‌شود، در جانداران مختلف، تفاوت داشته و به تنش‌های غیرزیستی و زیستی پاسخ می‌دهد (Tang et al., 2018; Wu et al., 2021).

در طی بیوسنتر اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFAها<sup>1</sup>) در سلول‌ها، مراحل مختلف اشباع و طویل شدن به عنوان بخشی از یک مسیر پیچیده رخ می‌دهد (شکل ۱). وارد کردن پیوند دوگانه به زنجیره هیدروکربنی اسیدهای چرب اشباع و تبدیل آنها به نوع غیراشباع یکی از این مراحل است که توسط

آنزیم‌های اسید چرب دساقوراز تنظیم می‌شود (Lee et al., 2016). مهمترین اسید چرب دساقورازهای گیاهی شامل دساقورازهای آسیل-لیپید، دساقورازهای محلول و Li-Beisson et al., 2013) امکان<sup>۲</sup> و امکان<sup>۳</sup> هستند (Li-Beisson et al., 2013). قارچ‌ها و باکتری‌ها نیز دارای اسید چرب دساقورازهای متعددی می‌باشند که ممکن است نقش متفاوتی نسبت به دساقورازهای گیاهی داشته باشند (Lu et al., 2020; Racine & Deckelbaum, 2007). اسیدهای چرب غیراشباع سنتز شده توسط این دساقورازها در ساختار غشا، سیالیت و سایر عملکردهای سلولی این جانداران دخالت دارند. تنظیم و تغییر لیپیدهای غشایی توسط دساقورازهای متصل به غشا، از جمله اسید آسیل لیپید D9-Dساقوراز (ADS) و اسفنگولیپیدهای Li-Beisson et al., 2014) انجام می‌شود (D4). یک ویژگی مشترک در ساختار همه پروتئین‌های دساقوراز حضور موتیف‌های هیستیدین حفاظت شده می‌باشد. این موتیف حاوی یک ناحیه اتصال دای-آهن است که پیوند C-H را برای تولید آب طی فرآیند غیراشباع سازی جدا می‌کند (Alonso et al., 2003; Díaz et al., 2018). تقریباً ۶۰۰ زن مختلف، از جمله ژن‌های کدکننده اسیدهای چرب دساقوراز، در مسیر سازمان‌دهی ساختارهای متعدد آسیل-لیپیدی در Li-Beisson et al., 2013) نقش دارند (*Arabidopsis thaliana*). از کاربردهای دستورالعمل اسید چرب دساقورازها می‌توان به افزایش محتوای اسیدهای چرب غیراشباع و بهبود ارزش تغذیه‌ای روغن‌های گیاهی، تغییر ترکیب و پروفایل اسیدهای چرب، افزایش تحمل به تنش‌های محیطی مانند دمای بیش از حد، خشکی و حمله عوامل بیمارگر، مهندسی متابولیک، تولید سوخت زیستی و نیز تولید مکمل‌های رژیمی، ترکیبات دارویی و تغذیه‌ای اشاره کرد. مهندسی ژنتیک اسید چرب دساقورازهای گیاهان ریزجانداران نیازمند شناخت ساختار، عملکرد و نقش‌های فیزیولوژیکی این ترکیبات می‌باشد. برای دستیابی به این منظور، در مطالعه حاضر، توالی ژنوم کامل *A. platensis* با ابزارهای بیوانفورماتیکی مختلف مورد جستجو قرار گرفته و ژن‌های اسید چرب دساقوراز شناسایی و برای ارزیابی خصوصیات مختلف ساختاری و عملکردی مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج این تحقیق یک تصویر کامل از اسید چرب دساقورازهای سیانوباکتریایی ارائه می‌کند که می‌تواند در برنامه‌های دستورالعمل مسیر سنتز اسیدهای چرب غیراشباع مورد استفاده قرار گیرد.

<sup>1</sup>. Fatty acids<sup>2</sup>. Fatty acid desaturases<sup>3</sup>. Polyunsaturated fatty acids



شکل ۱. مسیر بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه در ریزجلبک اسپیروولینا، به دست آمده از پایگاه KEGG (Kanehisa, 2002)

(Racine & Deckelbaum, 2007). ریزجانداران به دلیل توانایی بالای تولید ترکیبات مختلف، نرخ رشد بالا در محیط‌های غیرپیچیده و سهولت دستورالعمل ژنتیکی یک منبع بسیار ارزنده برای استحصال لیپیدها می‌باشد. برخی از مخمرها و کپک‌ها به عنوان ریزجانداران روغنی شناخته می‌شوند. سطوح بالایی از تری‌اسیل گلیسرول‌ها در این موجودات انباسته می‌شود که ممکن است حتی تا ۷۰ درصد وزن زیست توده را تشکیل دهد (Kumar et al., 2021; Ratledge & Wynn, 2002).

ریزجلبک *Arthrospira platensis* توانایی بالای تولید متابولیت‌های زیست فعال را دارد (Khan et al., 2005; Mazo et al., 2004). محتوای پروتئین این گونه بیش از ۶۰ درصد توده خشک را تشکیل داده و منبع غنی پروتئین است، حاوی مقادیر قابل توجهی از لیپید (۷/۲ درصد وزنی)، کربوهیدرات (۱۰/۳ درصد وزنی بر وزن)، فیر خام (۸/۵ درصد) و مواد معدنی (۶/۹ درصد وزنی بر وزن) می‌باشد (Ciferri & Tiboni, 1985).

*Arthrospira platensis* منبع غنی اسیدهای آمینه ضروری، اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه، اسید γ-لینولنیک (GLA)<sup>۱</sup> و استرول‌ها است

2. γ-linolenic acid

## پیشینه پژوهش

مزایای سلامتی بخش اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه با زنجیره بسیار بلند (VLC-PUFAs)، مانند اسید آراشیدونیک (ARA؛ ۲۰:۵و۳)، ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA؛ ۲۰:۴و۶)، اسید دوکواهگزانوئیک (DHA؛ ۲۲:۶و۳)، توجه بسیاری را به خود معطوف کرده است (Connor et al., 2007; Zárate et al., 2017). این ترکیبات از اجزای ساختاری فسفولیپیدهای غشایی بوده و از طرفی به عنوان پیش سازهای خانواده ایکوزانوئیدهای مولکول‌های سیگنال دهنده، از جمله پروستاگلاندین‌ها، ترومبوکسان‌ها و لکوتربین‌ها، نقش ایفا می‌کنند (Abedi & Sahari, 2014). علاوه بر کنترل اثرات تنظیمی و فعالیت‌های فیزیولوژیکی درون سلول، VLC-PUFA‌ها نقش مهمی در تغذیه کودکان دارند (Kaur et al., 2014; Schuchardt et al., 2010).

ماهیان و رogen‌های خوارکی حاصل از آن‌ها منابع غذایی اصلی حاوی VLC-PUFA‌ها می‌باشند، اما با توجه به کاهش جمعیت ماهیان وحشی و همچنین آلودگی روزافزون دریاها و اقیانوس‌ها، به منابع پایدار جایگزین برای این امر نیاز می‌باشد

1. Very-long-chain polyunsaturated fatty acids

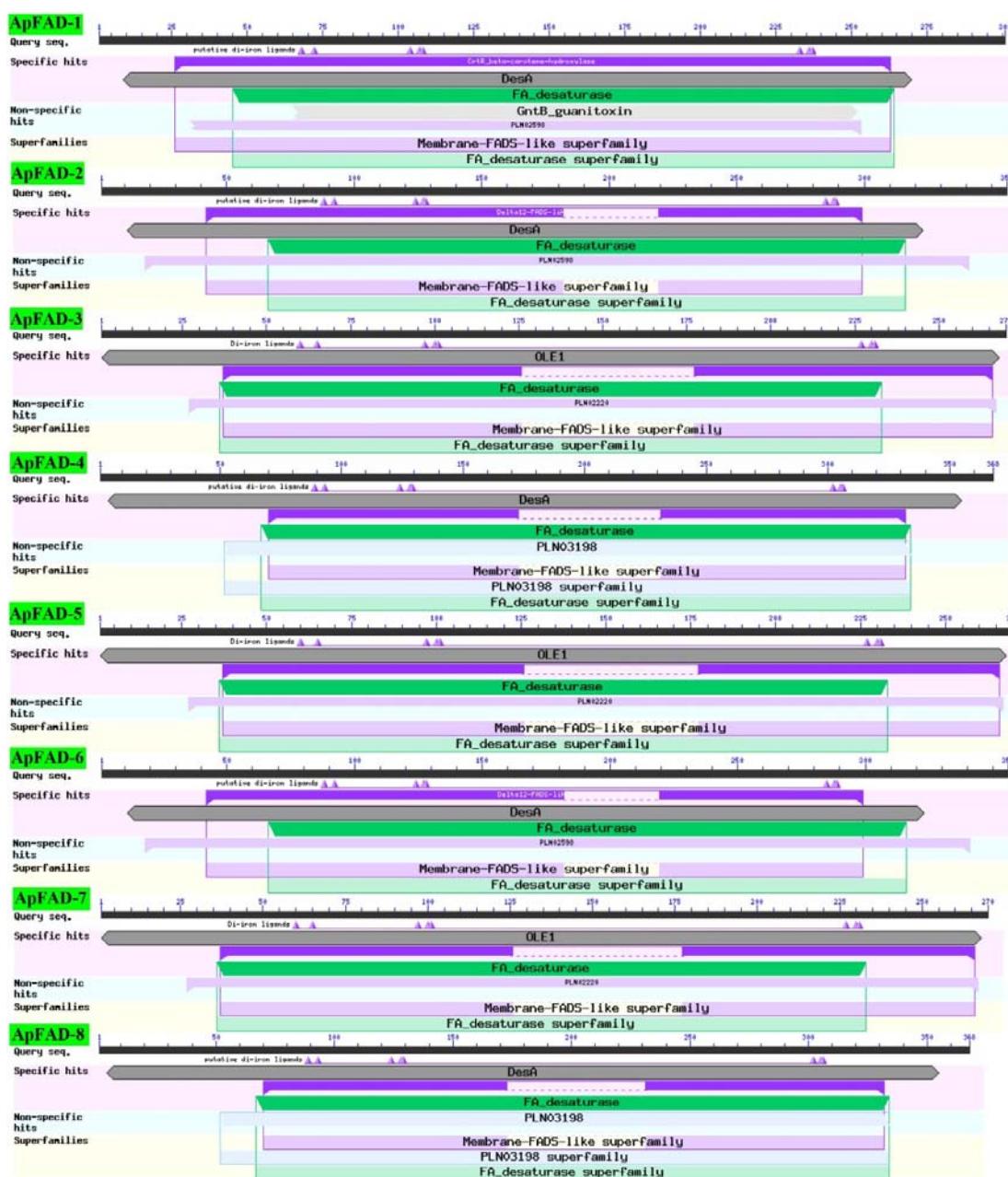
گزارش شده است (Kargiotidou *et al.*, 2008). علاوه بر این، با خاموش کردن سه ایزوفرم *GmFAD3* در گیاه سویا، مقاومت در برابر ویروس لکه‌ای غلاف لوپیا در نهال‌ها کاهش یافته است (Singh *et al.*, 2011). کیفیت روغن‌های خوراکی نیز به محتوای FADs که سطح اسیدهای چرب غیراشباع را تنظیم می‌کنند، بستگی دارد (Zárate *et al.*, 2017). همچنین، ژن‌های *FAD* می‌توانند توانایی مقابله با تنش‌های مختلف، مانند شوری، خشکی، سرما، گرما و عوامل بیماری‌زا را به طور قابل توجهی در گونه‌های مختلف تنظیم کنند (Domínguez *et al.*, 2010; Hajjiahmadi *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2011). بنابراین، ژن‌های *FAD* در مسیرهای حیاتی مختلف وظایف مهمی را برای تولید PUFA‌ها ایفا می‌کنند. در این راستا، بررسی خصوصیات مختلف ساختاری و عملکردی این ژن‌ها و پروتئین‌ها، با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی، در *Arthrosphaera platensis* می‌تواند مسیر را برای درک دقیق مکانیسم عمل FAD‌ها در سلول و همچنین کاندید کردن ژن‌ها به منظور مطالعات انتقال ژن و بیش‌بیان، برای بهبود تولید متابولیت‌های ارزشمند در گونه‌های مختلف، هموار کند.

## روش شناسی پژوهش

**A. platensis** ژن‌های خانواده *FAD* در ژنوم C1 در NIES-39 تا کنون جدایه‌های مختلفی از *A. platensis* از جمله A1, C1, KCTC, PCC, NIES-46, NIES-39, C1, C16, C18:1n-7, C18:1n-9, C14:0, C18:2n-6, C18:3n-6, C18:3n-9, C18:3n-10, C18:3n-12, C18:3n-13, C18:3n-14, C18:3n-15, C18:3n-16, C18:3n-17, C18:3n-18, C18:3n-19, C18:3n-20, C18:3n-21, C18:3n-22, C18:3n-23, C18:3n-24, C18:3n-25, C18:3n-26, C18:3n-27, C18:3n-28, C18:3n-29, C18:3n-30, C18:3n-31, C18:3n-32, C18:3n-33, C18:3n-34, C18:3n-35, C18:3n-36, C18:3n-37, C18:3n-38, C18:3n-39, C18:3n-40, C18:3n-41, C18:3n-42, C18:3n-43, C18:3n-44, C18:3n-45, C18:3n-46, C18:3n-47, C18:3n-48, C18:3n-49, C18:3n-50, C18:3n-51, C18:3n-52, C18:3n-53, C18:3n-54, C18:3n-55, C18:3n-56, C18:3n-57, C18:3n-58, C18:3n-59, C18:3n-60, C18:3n-61, C18:3n-62, C18:3n-63, C18:3n-64, C18:3n-65, C18:3n-66, C18:3n-67, C18:3n-68, C18:3n-69, C18:3n-70, C18:3n-71, C18:3n-72, C18:3n-73, C18:3n-74, C18:3n-75, C18:3n-76, C18:3n-77, C18:3n-78, C18:3n-79, C18:3n-80, C18:3n-81, C18:3n-82, C18:3n-83, C18:3n-84, C18:3n-85, C18:3n-86, C18:3n-87, C18:3n-88, C18:3n-89, C18:3n-90, C18:3n-91, C18:3n-92, C18:3n-93, C18:3n-94, C18:3n-95, C18:3n-96, C18:3n-97, C18:3n-98, C18:3n-99, C18:3n-100, C18:3n-101, C18:3n-102, C18:3n-103, C18:3n-104, C18:3n-105, C18:3n-106, C18:3n-107, C18:3n-108, C18:3n-109, C18:3n-110, C18:3n-111, C18:3n-112, C18:3n-113, C18:3n-114, C18:3n-115, C18:3n-116, C18:3n-117, C18:3n-118, C18:3n-119, C18:3n-120, C18:3n-121, C18:3n-122, C18:3n-123, C18:3n-124, C18:3n-125, C18:3n-126, C18:3n-127, C18:3n-128, C18:3n-129, C18:3n-130, C18:3n-131, C18:3n-132, C18:3n-133, C18:3n-134, C18:3n-135, C18:3n-136, C18:3n-137, C18:3n-138, C18:3n-139, C18:3n-140, C18:3n-141, C18:3n-142, C18:3n-143, C18:3n-144, C18:3n-145, C18:3n-146, C18:3n-147, C18:3n-148, C18:3n-149, C18:3n-150, C18:3n-151, C18:3n-152, C18:3n-153, C18:3n-154, C18:3n-155, C18:3n-156, C18:3n-157, C18:3n-158, C18:3n-159, C18:3n-160, C18:3n-161, C18:3n-162, C18:3n-163, C18:3n-164, C18:3n-165, C18:3n-166, C18:3n-167, C18:3n-168, C18:3n-169, C18:3n-170, C18:3n-171, C18:3n-172, C18:3n-173, C18:3n-174, C18:3n-175, C18:3n-176, C18:3n-177, C18:3n-178, C18:3n-179, C18:3n-180, C18:3n-181, C18:3n-182, C18:3n-183, C18:3n-184, C18:3n-185, C18:3n-186, C18:3n-187, C18:3n-188, C18:3n-189, C18:3n-190, C18:3n-191, C18:3n-192, C18:3n-193, C18:3n-194, C18:3n-195, C18:3n-196, C18:3n-197, C18:3n-198, C18:3n-199, C18:3n-200, C18:3n-201, C18:3n-202, C18:3n-203, C18:3n-204, C18:3n-205, C18:3n-206, C18:3n-207, C18:3n-208, C18:3n-209, C18:3n-210, C18:3n-211, C18:3n-212, C18:3n-213, C18:3n-214, C18:3n-215, C18:3n-216, C18:3n-217, C18:3n-218, C18:3n-219, C18:3n-220, C18:3n-221, C18:3n-222, C18:3n-223, C18:3n-224, C18:3n-225, C18:3n-226, C18:3n-227, C18:3n-228, C18:3n-229, C18:3n-230, C18:3n-231, C18:3n-232, C18:3n-233, C18:3n-234, C18:3n-235, C18:3n-236, C18:3n-237, C18:3n-238, C18:3n-239, C18:3n-240, C18:3n-241, C18:3n-242, C18:3n-243, C18:3n-244, C18:3n-245, C18:3n-246, C18:3n-247, C18:3n-248, C18:3n-249, C18:3n-250, C18:3n-251, C18:3n-252, C18:3n-253, C18:3n-254, C18:3n-255, C18:3n-256, C18:3n-257, C18:3n-258, C18:3n-259, C18:3n-260, C18:3n-261, C18:3n-262, C18:3n-263, C18:3n-264, C18:3n-265, C18:3n-266, C18:3n-267, C18:3n-268, C18:3n-269, C18:3n-270, C18:3n-271, C18:3n-272, C18:3n-273, C18:3n-274, C18:3n-275, C18:3n-276, C18:3n-277, C18:3n-278, C18:3n-279, C18:3n-280, C18:3n-281, C18:3n-282, C18:3n-283, C18:3n-284, C18:3n-285, C18:3n-286, C18:3n-287, C18:3n-288, C18:3n-289, C18:3n-290, C18:3n-291, C18:3n-292, C18:3n-293, C18:3n-294, C18:3n-295, C18:3n-296, C18:3n-297, C18:3n-298, C18:3n-299, C18:3n-300, C18:3n-301, C18:3n-302, C18:3n-303, C18:3n-304, C18:3n-305, C18:3n-306, C18:3n-307, C18:3n-308, C18:3n-309, C18:3n-310, C18:3n-311, C18:3n-312, C18:3n-313, C18:3n-314, C18:3n-315, C18:3n-316, C18:3n-317, C18:3n-318, C18:3n-319, C18:3n-320, C18:3n-321, C18:3n-322, C18:3n-323, C18:3n-324, C18:3n-325, C18:3n-326, C18:3n-327, C18:3n-328, C18:3n-329, C18:3n-330, C18:3n-331, C18:3n-332, C18:3n-333, C18:3n-334, C18:3n-335, C18:3n-336, C18:3n-337, C18:3n-338, C18:3n-339, C18:3n-340, C18:3n-341, C18:3n-342, C18:3n-343, C18:3n-344, C18:3n-345, C18:3n-346, C18:3n-347, C18:3n-348, C18:3n-349, C18:3n-350, C18:3n-351, C18:3n-352, C18:3n-353, C18:3n-354, C18:3n-355, C18:3n-356, C18:3n-357, C18:3n-358, C18:3n-359, C18:3n-360, C18:3n-361, C18:3n-362, C18:3n-363, C18:3n-364, C18:3n-365, C18:3n-366, C18:3n-367, C18:3n-368, C18:3n-369, C18:3n-370, C18:3n-371, C18:3n-372, C18:3n-373, C18:3n-374, C18:3n-375, C18:3n-376, C18:3n-377, C18:3n-378, C18:3n-379, C18:3n-380, C18:3n-381, C18:3n-382, C18:3n-383, C18:3n-384, C18:3n-385, C18:3n-386, C18:3n-387, C18:3n-388, C18:3n-389, C18:3n-390, C18:3n-391, C18:3n-392, C18:3n-393, C18:3n-394, C18:3n-395, C18:3n-396, C18:3n-397, C18:3n-398, C18:3n-399, C18:3n-400, C18:3n-401, C18:3n-402, C18:3n-403, C18:3n-404, C18:3n-405, C18:3n-406, C18:3n-407, C18:3n-408, C18:3n-409, C18:3n-410, C18:3n-411, C18:3n-412, C18:3n-413, C18:3n-414, C18:3n-415, C18:3n-416, C18:3n-417, C18:3n-418, C18:3n-419, C18:3n-420, C18:3n-421, C18:3n-422, C18:3n-423, C18:3n-424, C18:3n-425, C18:3n-426, C18:3n-427, C18:3n-428, C18:3n-429, C18:3n-430, C18:3n-431, C18:3n-432, C18:3n-433, C18:3n-434, C18:3n-435, C18:3n-436, C18:3n-437, C18:3n-438, C18:3n-439, C18:3n-440, C18:3n-441, C18:3n-442, C18:3n-443, C18:3n-444, C18:3n-445, C18:3n-446, C18:3n-447, C18:3n-448, C18:3n-449, C18:3n-450, C18:3n-451, C18:3n-452, C18:3n-453, C18:3n-454, C18:3n-455, C18:3n-456, C18:3n-457, C18:3n-458, C18:3n-459, C18:3n-460, C18:3n-461, C18:3n-462, C18:3n-463, C18:3n-464, C18:3n-465, C18:3n-466, C18:3n-467, C18:3n-468, C18:3n-469, C18:3n-470, C18:3n-471, C18:3n-472, C18:3n-473, C18:3n-474, C18:3n-475, C18:3n-476, C18:3n-477, C18:3n-478, C18:3n-479, C18:3n-480, C18:3n-481, C18:3n-482, C18:3n-483, C18:3n-484, C18:3n-485, C18:3n-486, C18:3n-487, C18:3n-488, C18:3n-489, C18:3n-490, C18:3n-491, C18:3n-492, C18:3n-493, C18:3n-494, C18:3n-495, C18:3n-496, C18:3n-497, C18:3n-498, C18:3n-499, C18:3n-500, C18:3n-501, C18:3n-502, C18:3n-503, C18:3n-504, C18:3n-505, C18:3n-506, C18:3n-507, C18:3n-508, C18:3n-509, C18:3n-510, C18:3n-511, C18:3n-512, C18:3n-513, C18:3n-514, C18:3n-515, C18:3n-516, C18:3n-517, C18:3n-518, C18:3n-519, C18:3n-520, C18:3n-521, C18:3n-522, C18:3n-523, C18:3n-524, C18:3n-525, C18:3n-526, C18:3n-527, C18:3n-528, C18:3n-529, C18:3n-530, C18:3n-531, C18:3n-532, C18:3n-533, C18:3n-534, C18:3n-535, C18:3n-536, C18:3n-537, C18:3n-538, C18:3n-539, C18:3n-540, C18:3n-541, C18:3n-542, C18:3n-543, C18:3n-544, C18:3n-545, C18:3n-546, C18:3n-547, C18:3n-548, C18:3n-549, C18:3n-550, C18:3n-551, C18:3n-552, C18:3n-553, C18:3n-554, C18:3n-555, C18:3n-556, C18:3n-557, C18:3n-558, C18:3n-559, C18:3n-560, C18:3n-561, C18:3n-562, C18:3n-563, C18:3n-564, C18:3n-565, C18:3n-566, C18:3n-567, C18:3n-568, C18:3n-569, C18:3n-570, C18:3n-571, C18:3n-572, C18:3n-573, C18:3n-574, C18:3n-575, C18:3n-576, C18:3n-577, C18:3n-578, C18:3n-579, C18:3n-580, C18:3n-581, C18:3n-582, C18:3n-583, C18:3n-584, C18:3n-585, C18:3n-586, C18:3n-587, C18:3n-588, C18:3n-589, C18:3n-590, C18:3n-591, C18:3n-592, C18:3n-593, C18:3n-594, C18:3n-595, C18:3n-596, C18:3n-597, C18:3n-598, C18:3n-599, C18:3n-600, C18:3n-601, C18:3n-602, C18:3n-603, C18:3n-604, C18:3n-605, C18:3n-606, C18:3n-607, C18:3n-608, C18:3n-609, C18:3n-610, C18:3n-611, C18:3n-612, C18:3n-613, C18:3n-614, C18:3n-615, C18:3n-616, C18:3n-617, C18:3n-618, C18:3n-619, C18:3n-620, C18:3n-621, C18:3n-622, C18:3n-623, C18:3n-624, C18:3n-625, C18:3n-626, C18:3n-627, C18:3n-628, C18:3n-629, C18:3n-630, C18:3n-631, C18:3n-632, C18:3n-633, C18:3n-634, C18:3n-635, C18:3n-636, C18:3n-637, C18:3n-638, C18:3n-639, C18:3n-640, C18:3n-641, C18:3n-642, C18:3n-643, C18:3n-644, C18:3n-645, C18:3n-646, C18:3n-647, C18:3n-648, C18:3n-649, C18:3n-650, C18:3n-651, C18:3n-652, C18:3n-653, C18:3n-654, C18:3n-655, C18:3n-656, C18:3n-657, C18:3n-658, C18:3n-659, C18:3n-660, C18:3n-661, C18:3n-662, C18:3n-663, C18:3n-664, C18:3n-665, C18:3n-666, C18:3n-667, C18:3n-668, C18:3n-669, C18:3n-670, C18:3n-671, C18:3n-672, C18:3n-673, C18:3n-674, C18:3n-675, C18:3n-676, C18:3n-677, C18:3n-678, C18:3n-679, C18:3n-680, C18:3n-681, C18:3n-682, C18:3n-683, C18:3n-684, C18:3n-685, C18:3n-686, C18:3n-687, C18:3n-688, C18:3n-689, C18:3n-690, C18:3n-691, C18:3n-692, C18:3n-693, C18:3n-694, C18:3n-695, C18:3n-696, C18:3n-697, C18:3n-698, C18:3n-699, C18:3n-700, C18:3n-701, C18:3n-702, C18:3n-703, C18:3n-704, C18:3n-705, C18:3n-706, C18:3n-707, C18:3n-708, C18:3n-709, C18:3n-710, C18:3n-711, C18:3n-712, C18:3n-713, C18:3n-714, C18:3n-715, C18:3n-716, C18:3n-717, C18:3n-718, C18:3n-719, C18:3n-720, C18:3n-721, C18:3n-722, C18:3n-723, C18:3n-724, C18:3n-725, C18:3n-726, C18:3n-727, C18:3n-728, C18:3n-729, C18:3n-730, C18:3n-731, C18:3n-732, C18:3n-733, C18:3n-734, C18:3n-735, C18:3n-736, C18:3n-737, C18:3n-738, C18:3n-739, C18:3n-740, C18:3n-741, C18:3n-742, C18:3n-743, C18:3n-744, C18:3n-745, C18:3n-746, C18:3n-747, C18:3n-748, C18:3n-749, C18:3n-750, C18:3n-751, C18:3n-752, C18:3n-753, C18:3n-754, C18:3n-755, C18:3n-756, C18:3n-757, C18:3n-758, C18:3n-759, C18:3n-760, C18:3n-761, C18:3n-762, C18:3n-763, C18:3n-764, C18:3n-765, C18:3n-766, C18:3n-767, C18:3n-768, C18:3n-769, C18:3n-770, C18:3n-771, C18:3n-772, C18:3n-773, C18:3n-774, C18:3n-775, C18:3n-776, C18:3n-777, C18:3n-778, C18:3n-779, C18:3n-780, C18:3n-781, C18:3n-782, C18:3n-783, C18:3n-784, C18:3n-785, C18:3n-786, C18:3n-787, C18:3n-788, C18:3n-789, C18:3n-790, C18:3n-791, C18:3n-792, C18:3n-793, C18:3n-794, C18:3n-795, C18:3n-796, C18:3n-797, C18:3n-798, C18:3n-799, C18:3n-800, C18:3n-801, C18:3n-802, C18:3n-803, C18:3n-804, C18:3n-805, C18:3n-806, C18:3n-807, C18:3n-808, C18:3n-809, C18:3n-810, C18:3n-811, C18:3n-812, C18:3n-813, C18:3n-814, C18:3n-815, C18:3n-816, C18:3n-817, C18:3n-818, C18:3n-819, C18:3n-820, C18:3n-821, C18:3n-822, C18:3n-823, C18:3n-824, C18:3n-825, C18:3n-826, C18:3n-827, C18:3n-828, C18:3n-829, C18:3n-830, C18:3n-831, C18:3n-832, C18:3n-833, C18:3n-834, C18:3n-835, C18:3n-836, C18:3n-837, C18:3n-838, C18:3n-839, C18:3n-840, C18:3n-841, C18:3n-842, C18:3n-843, C18:3n-844, C18:3n-845, C18:3n-846, C18:3n-847, C18:3n-848, C18:3n-849, C18:3n-850, C18:3n-851, C18:3n-852, C18:3n-853, C18:3n-854, C18:3n-855, C18:3n-856, C18:3n-857, C18:3n-858, C18:3n-859, C18:3n-860, C18:3n-861, C18:3n-862, C18:3n-863, C18:3n-864, C18:3n-865, C18:3n-866, C18:3n-867, C18:3n-868, C18:3n-869, C18:3n-870, C18:3n-871, C18:3n-872, C18:3n-873, C18:3n-874, C18:3n-875, C18:3n-876, C18:3n-877, C18:3n-878, C18:3n-879, C18:3n-880, C18:3n-881, C18:3n-882, C18:3n-883, C18:3n-884, C18:3n-885, C18:3n-886, C18:3n-887, C18:3n-888, C18:3n-889, C18:3n-890, C18:3n-891, C18:3n-892, C18:3n-893, C18:3n-894, C18:3n-895, C18:3n-896, C18:3n-897, C18:3n-898, C18:3n-899, C18:3n-900, C18:3n-901, C18:3n-902, C18:3n-903, C18:3n-904, C18:3n-905, C18:3n-906, C18:3n-907, C18:3n-908, C18:3n-909, C18:3n-910, C18:3n-911, C18:3n-912, C18:3n-913, C18:3n-914, C18:3n-915, C18:3n-916, C18:3n-917, C18:3n-918, C18:3n-919, C18:3n-920, C18:3n-921, C18:3n-922, C18:3n-923, C18:3n-924, C18:3n-925, C18:3n-926, C18:3n-927, C18:3n-928, C18:3n-929, C18:3n-930, C18:3n-931, C18:3n-932, C18:3n-933, C18:3n-934, C18:3n-935, C18:3n-936, C18:3n-937, C18:3n-938, C18:3n-939, C18:3n-940, C18:3n-941, C18:3n-942, C18:3n-943, C18:3n-944, C18:3n-945, C18:3n-946, C18:3n-947, C18:3n-948, C18:3n-949, C18:3n-950, C18:3n-951, C18:3n-952, C18:3n-953, C18:3n-954, C18:3n-955, C18:3n-956, C18:3n-957, C18:3n-958, C18:3n-959, C18:3n-960, C18:3n-961, C18:3n-962, C18:3n-963, C18:3n-964, C18:3n-965, C1

Schultz ) (http://smart.embl-heidelberg.de) SMART (et al., 2000) حضور دمین‌های اختصاصی در اعضای این خانواده ژنی تایید شد (شکل ۲). توالی‌های DNA و مکان کروموزومی مربوط به این ژن‌ها از ژنوم کامل جدایه C1 استخراج شد و ژن‌ها بر اساس ترتیب قرارگیری در ژنوم اسپیروولینا نام‌گذاری شدند. خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های ApFAD با استفاده از برنامه ProtParam (https://web.expasy.org/protparam) ExPasy (Gasteiger et al., 2005) پیش‌بینی شدند.

پروتئین‌های FAD در *Arabidopsis thaliana* نیز از پایگاه Garcia- (https://www.arabidopsis.org) TAIRداده Hernandez et al., 2002 استخراج و به عنوان الگو برای انجام جستجوهای BLASTp در برابر ژنوم اسپیروولینا با مقدار  $E < 10^{-10}$  مورد جستجو قرار گرفت. پروتئین‌های FAD شناسایی شده با هر دو روش ادغام شدند و توالی‌های تکراری و یا فاقد دمین اختصاصی کامل به صورت دستی حذف شدند. در نهایت تعداد ۸ توالی کامل و غیر تکراری تایید و با استفاده از برنامه‌های Pfam (Bateman et al., 2004) (http://pfam.xfam.org)



شکل ۲. بررسی حضور و موقعیت دمین‌های عملکردی اختصاصی در اعضای خانواده پروتئین‌های ApFAD

(softberry.com/berry.phtml?topic=cnnpromoter\_b) مورد شناسایی قرار گرفت و سپس عناصر تنظیمی عملکردی سیس در نواحی پرموتر ژن‌های ApFAD، با در نظر گرفتن ناحیه بالادستی ۱۰۰۰ جفت باز، به کمک برنامه Pepper.molgenrug.nl (de Jong et al., 2012) شناسایی شدند. بر اساس نتایج حاصل از آنالیزهای چون هستی‌شناسی ژنی و پرموتر، یکی از ژن‌های کلیدی ApFAD در فرآیندهای متابولیکی لیپید کاندید و شبکه تعامل (string-db.org) STRING v12.0 (Szklarczyk et al., 2016) پروتئین‌پروتئین با برنامه (Bailey et al., 2009) مورد استفاده قرار گرفت.

ثبت شده در اسپیروولینا پیش‌بینی شد.

### شبیه‌سازی پروفایل بیانی ژن‌های ApFAD بر اساس RNA-seq داده‌های

در مطالعه حاضر با توجه به عدم وجود داده‌های RNA-seq برای تمامی ژن‌های اسپیروولینا در شرایط تش مختلف، از الگوی بیان نزدیک‌ترین ارتولوگ برای هر ژن ApFAD در *Arabidopsis* استفاده شد. پروفایل بیانی ژن‌های FAD کاندید در شرایط تش‌های محیطی شوری، خشکی، اکسیداتیو، سرما و اسموتیک مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور مقادیر FPKM مربوط به بیان هر ژن در شرایط بیولوژیکی مختلف، از پلتفرم EMBL-EBI در پایگاه داده ELIXIR در Expression Atlas (Moreno et al., 2022) (ebi.ac.uk/gxa/experiments) استخراج شد. در مرحله نهایی مقادیر FPKM<sup>۱</sup> هر ژن به مقادیر log<sub>2</sub> تبدیل شده و برای ترسیم نقشه حرارتی مربوط به بیان این خانواده ژنی از نرم‌افزار TBtools استفاده شد (Chen et al., 2020).

### نتایج و بحث

**A. *platensis*** اعضای خانواده ژنی ApFAD در ژنوم *Arabidopsis* و ارزیابی خصوصیات فیزیکوشیمیایی ارزیابی سیستماتیک خانواده ژنی FAD در مقیاس ژنومی، می‌تواند یک اساس مولکولی قابل اتکا به منظور افزایش کیفیت روغن‌های خوارکی از طریق مهندسی متابولیک مسیر سنتز اسیدهای چرب غیراشبع فراهم کند. مطالعه ژنومی این خانواده در گونه‌های مختلف گیاهی و ریزجانداران، از قبیل *Arabidopsis* (Michaelson et al., 2009), *Chi et al.*, 2011)، سویا (Hajiahmadi et al., 2009)

### روابط فیلوجنتیکی و موتیف‌های حفاظت شده

#### ApFAD پروتئین‌های

توالی‌های پروتئینی خانواده FAD که در اسپیروولینا شناسایی شدند به همراه اعضای این خانواده ژنی در آرایدوفیسیس برای ارزیابی روابط فیلوجنتیکی بر اساس روش نزدیکترین همسایگی MEGAX (NJ)<sup>۲</sup> با ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپ از طریق نرم افزار (Kumar et al., 2018) استفاده شدند. برای شناسایی موتیف‌های پروتئینی حفاظت شده در ApFAD ها نیز، (Multiple Em for Motif Elicitation) MEME برنامه (Bailey et al., 2009) مورد استفاده قرار گرفت.

### ارزیابی هستی‌شناسی ژنی و تغییرات پس از ترجمه در اعضای خانواده ApFAD

ارزیابی هستی‌شناسی ژنی پروتئین‌های ApFAD، عملکردهای مولکولی، فرآیندهای بیولوژیکی و مکان‌های زیر سلولی CELLO2GO (Yu et al., 2014) (cello.life.nctu.edu.tw/cello2go/) پیش‌بینی شد (پروتئین‌های ApFAD، مانند فسفوریلاسیون، N-Nitrosoylasion، سومویلیشن<sup>۳</sup> و N-Glycosylation<sup>۴</sup>، به ترتیب NetPhosBac (Miller et al., 2009) ۰.۵ < ۱.۰) با مقدار پتانسیل services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhosBac- PredNTS (Miller et al., 2009) ۰.۵ < ۱.۰) با مقدار پتانسیل services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhosBac- PredNTS (kurata14.bio.kyutech.ac.jp/PredNTS/index.php) GPS-SUMO (Nilamyani et al., 2021) (Zhao et al., 2014) (sumo.biocuckoo.cn/index.php) Choudhary (proglycprot.org) ProGlycProt (et al., 2019) پیش‌بینی شد.

بررسی حضور عناصر تنظیمی سیس در ناحیه پرموتر ژن‌های خانواده ApFAD و سنجش روابط تعاملی در شبکه پروتئینی ناحیه پرموتری مربوط به هر یک از ژن‌های کاندید در سیانوباکتری با استفاده از برنامه CNNPromoter\_b

1. Neighbor joining
2. Phosphorylation
3. N-nitrosylation
4. Sumoylation
5. N-glycosylation

6. Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads

شدند، که حاکی از آب‌گریز بودن این پروتئین‌ها و همچنین پتانسیل آنها در پاسخگویی به تنش‌های محیطی (Rao *et al.*, 2008) می‌باشد.

**روابط فیلوجنتیکی و طبقه‌بندی پروتئین‌های ApFAD**

مطالعه روابط تکاملی پروتئین‌های ApFAD آنها را به چهار دسته اصلی Omega (با ۲ پروتئین امگا-۶) در گروه I-CrtR-بتاکاروتن هیدروکسیلاز (FAB2، با ۱ پروتئین) در گروه II، اسفنگولیپید (با ۲ پروتئین) در گروه III و آسیل-لیپید دساقوراز (First، شامل ۳ پروتئین) در گروه IV، طبقه‌بندی کرد، که پروتئین‌های حاضر در هر خوش‌فیلوجنتیکی الگوهای موتیف مشابهی را نشان دادند (شکل ۳ الف و ب). همه پروتئین‌های مربوط به دسته First حاوی الگوی حفاظت شده‌ای از موتیف‌های ۳، ۲ و ۱ در ساختار خود بودند، در حالی که ApFAD‌های مربوط به گروه اسفنگولیپید تنها موتیف‌های ۳، ۴ و ۶ را در ساختار خود دارند (شکل ۳ الف و ب و جدول ۳). در هر دو پروتئین امگای شناسایی شده ترکیب و ترتیب موتیف‌ها به صورت موتیف‌های ۳، ۵، ۴ و ۶ بود. همچنین، در تنها عضو پروتئین دساقوراز از گروه CrtR-بتاکاروتن هیدروکسیلاز نیز، علیرغم شاهد ساختاری آن با پروتئین‌های اسفنگولیپید، تنها دارای موتیف‌های شماره ۳ و ۶ در الگوی موتیف خود بود (شکل ۳ الف و ب). موتیف شماره ۳، Histidin Box 1، که سازنده یکی از بخش‌های عملکردی کلیدی در همه پروتئین‌های ApFAD است در همه اعضای خانواده ApFAD حضور داشت.

به طور کلی، چهار جعبه هیستیدین عملکردی بسیار حفاظت شده، سه مورد در قسمت انتهای آمینی و یک مورد در ناحیه انتهای کربوکسیلی، در تمام پروتئین‌های ApFAD شناسایی شدند (جدول ۴ و شکل ۳ ج).

(Chen *et al.*, 2019)، برنج (Tonon *et al.*, 2005) *Thalassiosira pseudonana* (Jia *et al.*, 2022) *Schizochytrium sp.* (Tang *et al.*, 2018) *Aspergillus* قارچ به اهمیت فراوان ریزجلبک اسپیروولینا در زمینه‌های مختلف صنعتی، تغذیه و دارویی، در مطالعه حاضر ژنوم کامل این ریزجلبک، به منظور جستجوی اعضای خانواده ژنی FAD که نقش بسزایی در تامین مواد مغذی و همچنین ایجاد مقاومت به تنش‌های مختلف دارد، مورد بررسی قرار گرفت پس از حذف توالی‌های تکراری و نیز موارد فاقد دمین اختصاصی کامل، تعداد ۸ پروتئین غیر تکراری بالقوه ApFAD در ژنوم *A. platensis* C1 شناسایی شدند (جدول ۱).

مطابق نتایج پیش‌بینی شده در این مطالعه، چهار نوع پروتئین Acyl-CoA desaturase (FAD2) Omega، ApFAD شامل (FAB2) CrtR\_beta-carotene-hydroxylase (First) و Sphingolipid desaturase پروتئین در اسپیروولینا شناسایی شدند (جدول ۲). خواص فیزیکوشیمیایی متنوعی در پروتئین‌های ApFAD پیش‌بینی شد وزن مولکولی پروتئین‌ها از ۳۱/۳۷ (در ۵/۱۵) تا ۴۲/۱۵ کیلو دالتون (در ۴-۴) متغیر بود. مقدار نقطه ایزواکتریک (pI) در پروتئین‌های از ۶/۲۹ (در ۸/۹) تا ۷/۰ (در ۱-۶) متغیر بود، با این حال، اکثر پروتئین‌های شناسایی شده (~۶۲٪) مقدار pI بیش از ۷ را نشان دادند، که ماهیت قلیایی اکثر این پروتئین‌ها را نشان می‌دهد (جدول ۲). مقدار شاخص ناپایداری (II) در ~۶۲٪ از ApFAD‌های شناسایی شده بیشتر از ۴۰ پیش‌بینی شد که نشان دهنده ناپایدار بودن این پروتئین‌ها می‌باشد. همچنین، پارامترهای شاخص آلفاتیک و میانگین کل هیدروپاتیک (GRAVY) پروتئین‌های ApFAD به ترتیب در محدوده ۸۹/۴۹ (در ۲-۱) تا ۱۰۱/۷۳ (در ۱-۰) و ۰-۰/۴۶ (در ۵-۲) تا ۰/۰ (در ۵-۲) پیش‌بینی شده.

#### جدول ۱. لیست ژن‌های FAD شناسایی شده در ژنوم ریزجلبک اسپیروولینا و مشخصات ژنتیکی آن‌ها

شناسه دسترسی در NCBI	نام ژن	Gene symbol	اندازه DNA	موقعیت ژنومی Genomic position	توصیف ژن Gene description
NCBI locus ID			DNA length (bp)		
AFXD01000010.1	<i>ApFAD-1</i>		906	304166..305071	fatty acid desaturase; CrtR_beta-carotene-hydroxylase
APLC1_0651	<i>ApFAD-2</i>		1071	600352..601422	Delta-12 acyl-phospholipid desaturase; OMEGA-6 FATTY ACID DESATURASE
AJ002065.1	<i>ApFAD-3</i>		1464	788338..789801	delta-9 desaturase, desC; Stearoyl-CoA desaturase (Delta-9 desaturase)
FJ752023.1	<i>ApFAD-4</i>		1151	833310..834461	delta-6 desaturase (D6d)
AF002252.1	<i>ApFAD-5</i>		813	1138073..1138438	delta-9 fatty acid desaturase, acyl-lipid desaturase
X86736.1	<i>ApFAD-6</i>		1282	1432941..1434223	delta-12 desaturase; desA; OMEGA-6 FATTY ACID DESATURASE
APLC1_2346	<i>ApFAD-7</i>		813	2236276..2237088	stearoyl-CoA desaturase (delta-9 desaturase)
APLC1_2499	<i>ApFAD-8</i>		1107	2397108..2398214	Delta6 Fatty Acid Desaturase (Delta6-FADS)-like

جدول ۲. خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های ApFAD شناسایی شده در ژنوم ریزجلبک اسپرولینا

نام ژن Gene symbol	شناسه Protein id	طول Protein length (aa)	وزن Molckoli MW (Da)	نقاطه ایزوکتریک pI	شاخص ناپایداری Instability index	شاخص آلیفاتیک Aliphatic index	متوجه هیدروپاتی کل GRAVY	نوع پروتئین Protein type	دومین عملکردی Domain
ApFAD-1	EKD10288.1	301	34889.59	8.9	43.74	101.73	0.151	CrtR_beta-carotene-hydroxylase; FAB2	FA_desaturase_2 (PF03405)
ApFAD-2	UWU45967.1	356	41842	6.56	42.28	89.49	-0.046	Omega 6; FAD2	FA_desaturase (PF00487)
ApFAD-3	CAA05166.1	270	31406.51	7.27	27.78	96.37	0.208	Acyl-CoA desaturase; First	FA_desaturase (PF00487), Lipid_DES (PF08557)
ApFAD-4	ACN65115.1	368	42154.73	6.48	40.69	98.26	0.181	Sphingolipid desaturase; FAB2	FA_desaturase_2 (PF03405)
ApFAD-5	AAD00996.1	270	31376.48	7.27	28.41	96.74	0.222	Acyl-CoA desaturase; First	FA_desaturase (PF00487), Lipid_DES (PF08557)
ApFAD-6	CAA60415.1	351	40928.39	7.8	42.05	91.03	0.063	Omega 6; FAD2	FA_desaturase (PF00487)
ApFAD-7	UWU47577.1	270	31406.51	7.27	27.78	96.37	0.208	Acyl-CoA desaturase; First	FA_desaturase (PF00487), Lipid_DES (PF08557)
ApFAD-8	UWU47727.1	368	42057.52	6.29	41.15	97.99	0.191	Sphingolipid desaturase; FAB2	FA_desaturase_2 (PF03405)

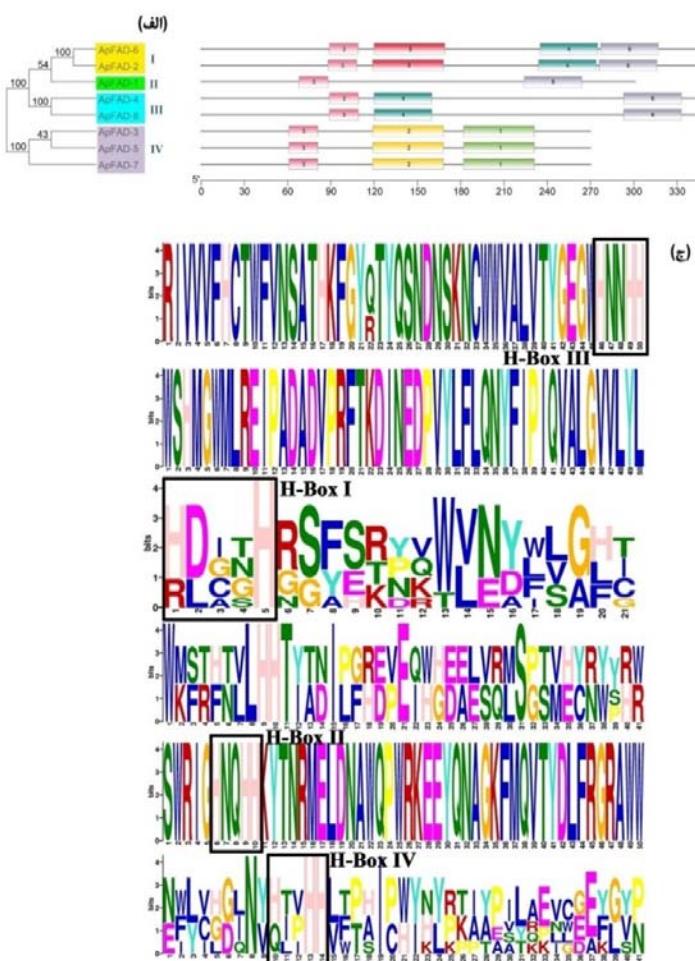
جدول ۳. مشخصات و الگوی موتیف‌های حفاظت شده پیش‌بینی شده در پروتئین‌های ApFAD

شماره موتیف Motifs No.	E-value	Sites	طول Width	توالی Sequence	مستندسازی Annotation
1	1.50E-06	3	50	RIVVVFHCTWFVNSATHKFGYQTYQSNDNSKNCWVVALVTYGEWHNNHH	C-terminal His-Box III
2	3.00E-06	3	50	WSHMGWMLREIPADADVPRFTKDINEDPVPYLFLQNYFIPIQVALGVVLYL	-
3	2.10E-02	7	21	HDITHRSFSRNKWVNLYLLGHT	N-terminal His-Box I
4	4.30E-03	4	41	WKFRHTLLHHTYADIPGRDPEQWGDELVRRLSPSVEYRWY	-
5	3.30E-03	2	50	SWRIGHNQHHKYTNRMELDNAWQPWRKEEYQNAGKFMQVTYDLFRGRAWW	His-Box II
6	3.40E-02	5	41	NWLVGJJNYHVHHLFPAPWYNRKAAPILAEVCEEYGYP	His-Box IV

اسفنگولیپید (ApFAD-4 و ApFAD-8) شناسایی شد. موتیف‌های هیستیدینی موجود در FAD‌های غشائی، عموماً با الگوهای H(X)2-3HH، H(X)3-4HH و H(X)2-3HH، گزارش شده‌اند و فعالیت کاتالیزوری این پروتئین‌ها به واسطه اتصال به ساختارهای دای-آهن از طریق همین نواحی حفاظت شده صورت می‌گیرد (Alonso *et al.*, 2003).

در مطالعه روابط تکاملی گونه‌های مختلف، رویدادهای نظیر مضاعف شدگی ژنی و حتی ژنومی، بسیار مشاهده می‌شود، بنابراین بررسی روابط تکاملی بین گونه‌ها می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در رابطه با عملکردهای ژنی و پروتئینی فراهم کند.

در واقع این ساختارهای هیستیدینی حفاظت شده که در پروتئین‌های FAD موجودات مختلف یافت می‌شود، موجب تنظیم عملکرد سلولی این پروتئین‌ها به ویژه در شرایط تشنج محیطی می‌شوند (Díaz *et al.*, 2018). جعبه هیستیدین ۱ (موتیف ۳) در تمام پروتئین‌های ApFAD، شناسایی شد، در حالی که جعبه هیستیدین ۲ (موتیف ۵) تنها در پروتئین‌های امگا (ApFAD-2 و ApFAD-6) پیش‌بینی شد (جدول ۳). همچنین، جعبه هیستیدین ۳ (موتیف ۱) فقط در ناحیه انتهایی کربوکسیلی پروتئین‌های مرتبط با گروه آسیل-لیپید دساقوراز (ApFAD-3، ApFAD-5 و ApFAD-7) پیش‌بینی شد، در حالی که جعبه هیستیدین ۴ (موتیف ۶) در گروه‌های CrtR- بتاکاروتون هیدروکسیلاز (ApFAD-1)، Omega



شکل ۳. روابط فیلوجنتیکی، الگوی موتیف‌های پروتئینی و لوگوی ساختاری مربوطه در پروتئین‌های ApFAD. (الف) بررسی روابط فیلوجنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGAX و ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپ بر مبنای روش نزدیکترین همسایگی (NJ) پروتئین‌های FAD در ژنوم اسپیروولینا را به چهار گروه اصلی تقسیم کرد. (ب) الگوی موتیف‌های پروتئینی در هر کلاستر منحصریفرد بود و موتیف شماره ۳ به عنوان ۱ His-Box پایه در همه پروتئین‌ها پیش‌بینی شد. (ج) بررسی لوگوهای پیش‌بینی شده برای هر موتیف وجود چهار ناحیه حفاظت شده His-Box را در پروتئین‌های ApFAD مشخص ساخت، که محور عمودی بیانگر میزان حفاظت شدگی اسیدهای آمینه و محور افقی نیز نشان دهنده توع و تعداد آن‌ها است.

جدول ۴. نواحی جعبه هیستیدین عملکردی و حفاظت شده در ساختار پروتئین‌های ApFAD در اسپیروولینا

شناسه ژن Gene ID	Box 1		Box 2		Box 3		Box 4	
	توالی Sequence	موقعیت Position	توالی Sequence	موقعیت Position	توالی Sequence	موقعیت Position	توالی Sequence	موقعیت Position
<i>ApFAD-1</i>	HDASH	68-88	-	-	-	-	HЛИHH	224-264
<i>ApFAD-2</i>	HDCGH	88-108	HNQHH	119-168	-	-	HIPHН	276-316
<i>ApFAD-3</i>	RLITH	61-81	-	-	HNNHH	182-231	-	-
<i>ApFAD-4</i>	HDGNH	89-109	-	-	-	-	HTVHH	293-333
<i>ApFAD-5</i>	RLITH	61-81	-	-	HNNHH	91-140	-	-
<i>ApFAD-6</i>	HDCGH	89-109	HNQHH	120-169	-	-	HIPHН	277-317
<i>ApFAD-7</i>	RLITH	61-81	-	-	HNNHH	182-231	-	-
<i>ApFAD-8</i>	HDGNH	89-109	-	-	-	-	QTВHH	293-333

اساس نتایج بدست آمده، پروتئین‌های FAD در شش گروه مختلف دسته‌بندی شدند (شکل ۴). FAD‌های مربوط به کلاس امگا در این گونه‌ها در گروه I طبقه‌بندی شدند، در حالی که گروه II تنها پروتئین مربوط به گروه CtrR-بتاکاروتون

برای ارزیابی بیشتر روابط تکاملی ژن‌های *FAD* یک درخت فیلوجنتیکی با استفاده از توالی‌های اسید آمینه *Arabidopsis* و *A. platensis* در FAD در *haliana* به عنوان یک موجود مدل تایید شده، ترسیم شد. بر

چرب (۳۷٪) و فرآیند متابولیکی لیپید (۳۱٪) ایفای نقش می‌کنند (شکل ۵). علاوه بر این، ۱۶ و ۱۱٪ از *ApFAD*‌ها، به ترتیب، دارای پتانسیل کنترل گلیکوزیلاسیون لیپیدها و بیوستز متابولیت‌های ثانویه بودند، که به نوبه خود بیانگر نقش پر اهمیت این پروتئین‌ها در اسپیرولینا به دنبال قرارگیری در شرایط دارای تنفس می‌باشد (*Lu et al., 2020*). علاوه بر این، برخی از ژن‌های *ApFAD* احتمالاً در تنظیم فرآیند متابولیکی اسید کربوکسیلیک (۵٪)، نقش دارند، که می‌تواند دخالت گسترده ژن‌های *ApFAD* را در فرآیندهای سلولی مختلف در طول چرخه زندگی اسپیرولینا نشان دهد (*Offermanns, 2017*).

تغییرات پس از ترجمه، که اثرات مهمی بر تنظیم واکنش‌های ناشی از محرک‌ها در موجودات زنده دارند (Hashiguchi & Komatsu, 2016)، نواحی دارای تغییرات فسفوریلاسیون، N-نیتروزیلاسیون، سومویلیشن و N-گلیکوزیلاسیون در پروتئین‌های *ApFAD* پیش‌بینی شدند. به جز یکی از پروتئین‌های *ApFAD* متعلق به گروه ۶، Omega-2 (ApFAD-2)، سایر پروتئین‌های *ApFAD* پتانسیل گلیکوزیله شدن اتم نیتروژن در یکی از اسید آمینه‌های آسپاراژین (N) خود را دارا بودند، که در این میان پروتئین‌های *ApFAD-4* و *ApFAD-8* متعلق به کلاس اسفنگولیپیدها، بالاترین پتانسیل را نشان دادند (شکل ۶ الف). نتایج بررسی تغییرات سومویلیشن در پروتئین‌های *ApFAD* بیانگر وجود حداقل یک تغییر در هر پروتئین بود؛ به طوریکه بیشترین اسید آمینه‌های تغییر یافته در پروتئین‌های *ApFAD-1*, *ApFAD-2*, *ApFAD-8* و *ApFAD-2*، (به ترتیب از دسته بتاکاروتون هیدروکسیلاز، امگا ۶ و اسفنگولیپید) یافت شدند (شکل ۶ ب). علاوه بر این، همه *ApFAD*‌های متعلق به کلاس آسیل-لیپید دساقوراز و همچنین *ApFAD-6* از گروه ۶ Omega، دارای تغییرات قابل توجهی در اسید آمینه لیزین (K) خود بودند (شکل ۶ ب و جدول S1).

تمامی پروتئین‌های *ApFAD* دارای نواحی گسترده‌ای از تغییرات نیتروزیلاسیون در اسید آمینه‌های سیستئین (C) خود بودند، که بالاترین میزان آن‌ها در پروتئین‌های گروه ۶ *Omega* اسپیرولینا یافت شد (شکل ۵). همچنین، پروتئین‌های گروه اسفنگولیپیدها و آسیل-لیپید دساقورازها نیز اسید آمینه‌های سیستئین نیتروزیله شده قابل توجهی را داشتند (جدول S1). محل‌های فسفوریلاسیون پس از ترجمه پروتئین‌های *ApFAD* طیف گسترده‌ای از باقیمانده‌های سرین فسفریله شده (S) همراه با برخی از مکان‌های تغییر یافته ترئونین (T) را نشان دادند (شکل ۶ د).

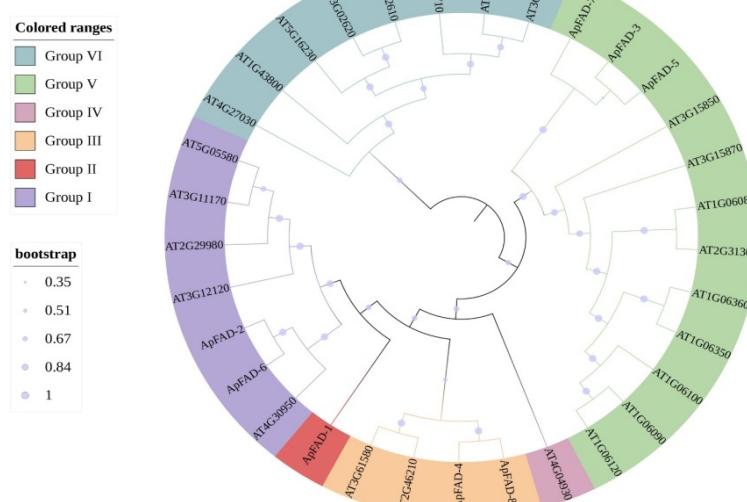
هیدروکسیلاز را در خانواده ژنی *FAD* در اسپیرولینا در بر می‌گیرد. همچنین، اعضای مرتبط با خوش‌های اسفنگولیپید در کلاس‌های III و IV گروه بندی شدند (شکل ۴). گروه V با ۱۲ عضو به عنوان بزرگترین کلاس در این درخت فیلوژنتیکی و به عنوان پروتئین‌های حاوی دمین‌های Lipid\_DES و FA\_desaturase (PF00487) (PF08557)، تحت عنوان گروه‌های آسیل-لیپید دساقوراز، شناسایی شد. گروه VI نیز با هشت عضو به عنوان گروه بزرگ دیگر، در برگیرنده پروتئین‌های *FAD4*، پیش‌بینی شدند. علاوه بر این، با توجه به تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی، *ApFAD*‌ها در همه گروه‌ها بجز گروه VI وجود داشتند که بیانگر فقدان پروتئین‌های کلاس *FAD4* در ژنوم اسپیرولینا می‌باشد، که این موضوع می‌تواند بیانگر امکان رخداد موتاسیون‌هایی در جهت *Lee (et al., 2016)* حذف یا تغییر نوع فعالیت کاتالیزوری این پروتئین‌ها باشد.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، می‌توان پیشنهاد کرد که منشأ تکاملی مشابهی ممکن است برای برخی از ژن‌های خوش‌بندی شده وجود داشته باشد، که پتانسیل ایجاد عملکردهای مشابهی را در سلول‌ها فراهم می‌سازد.

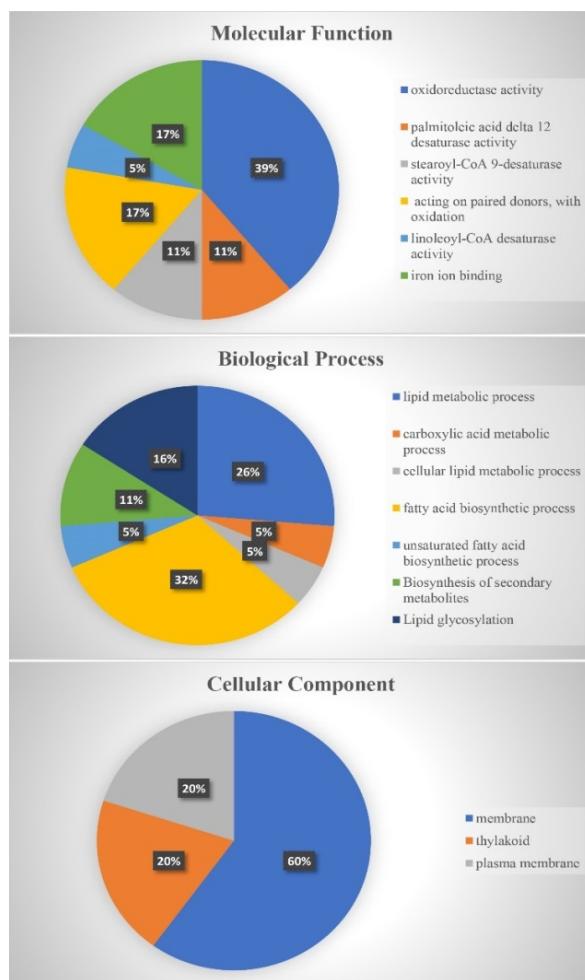
## تفسیر نتایج هستی‌شناسی ژنی و تغییرات پس از ترجمه

### در خانواده *ApFAD*

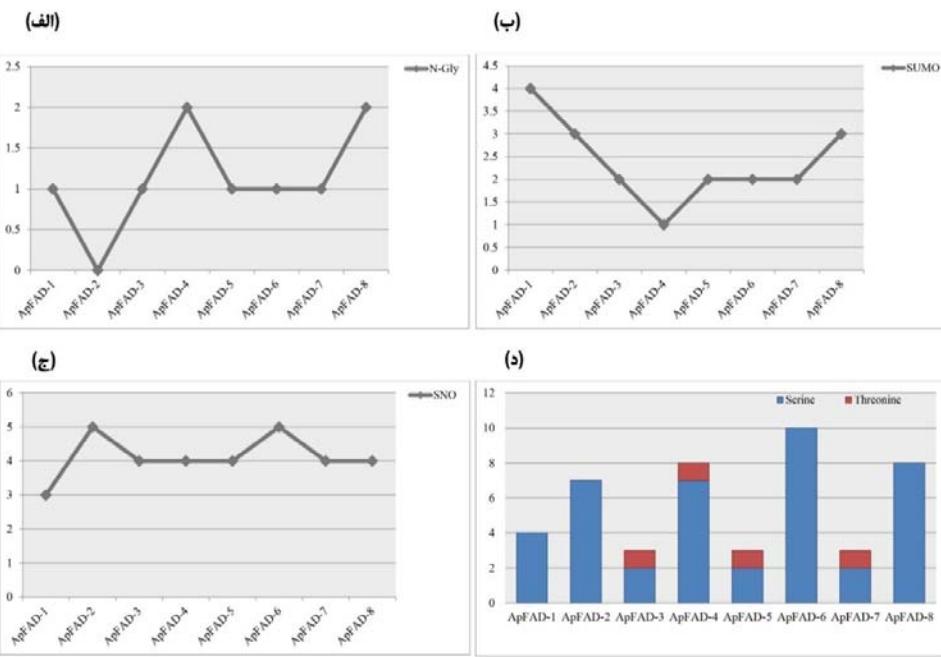
بر اساس نتایج هستی‌شناسی ژن، فرآیندهای بیولوژیکی تنظیم شده توسط ژن‌های خانواده *ApFAD*، مشارکت قابل توجه آنها را در فرآیندهای متابولیسم لیپید، فرآیندهای بیوستزی اسیدهای چرب و فرآیندهای اکسیداسیون-کاهش نشان داد. با توجه به تجزیه و تحلیل نتایج، بیشتر پروتئین‌های *ApFAD* در اسپیرولینا در غشاء سلولی (۶۰٪)، غشاء پلاسمایی (۲۰٪) و تیلاکوئید در کلروپلاست (۲۰٪) قرار گرفته‌اند (شکل ۵). پیش‌بینی عملکرد مولکولی ژن‌های *ApFAD* نشان داد که ۳۹ و ۱۷ درصد از آنها، به ترتیب در فعالیت اکسیدورودکتازی و اکسیداسیون اکسیژن مولکولی و تبدیل آن به دو مولکول آب، نقش دارند. علاوه بر این، ۱۷ درصد از *ApFAD*‌ها دارای این پتانسیل بودند که به عنوان مولکول تنظیم کننده در اتصال پروتئین‌ها به یون‌های آهن عمل کنند. علاوه بر این، ۱۱ و ۵ درصد از ژن‌های *ApFAD*، به ترتیب به عنوان آنزیم‌های دساقوراز تنظیم کننده اصلی در فعالیت مولکولی اسیدهای چرب پالمیتوئیک، استاراولیل-CoA و لینوئول-CoA نقش دارند (شکل ۵). نتایج حاصل از بررسی فرآیندهای بیولوژیکی نشان داد که بیشتر ژن‌های *ApFAD* در فرآیند بیوستزی اسیدهای



**شکل ۴.** بررسی روابط تکاملی بین پروتئین‌های خانواده FAD در ریز جلبک اسپیروولینا و گیاه مدل *Arabidopsis thaliana* آن‌ها را در شش کالاستر مختلف دسته‌بندی کرد، که هر گروه نمایانگر کلاستر عملکردی ویژه‌ای از پروتئین‌های FAD می‌باشد. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGAX و با تکرار ۱۰۰۰ بوت استرپ بر مبنای روش نزدیکترین همسایگی (NJ) ترسیم شد.



**شکل ۵.** نتایج حاصل از آنالیز هستی‌شناسی ژن (Gene Ontology) پروتئین‌های ApFAD در ریزجلبک اسپیرولینا و عملکردهای مختلف سلولی در مسیرهای متنوع عملکرد مولکولی، فعالیت بیولوژیکی و اجزای زیر سلولی.



شکل ۶. نتایج حاصل از بررسی تغییرات پس از ترجمه در بروتئین‌های گروه اسفنگولیپید یافت شد. (ب) بیشترین و کمترین میزان تغییرات سوموبلاسیون به ترتیب در تنها بروتئین گروه بتاکاروتون هیدروکسیلاز و ApFAD-4 از دسته ApFAD FAD-8. (ج) تغییرات نیتروبلاسیون دارای روند هماهنگی در پروتئین‌های ApFAD، با بالاترین میزان در گروه Omega ۶ نیمی از بروتئین‌های ApFAD تنها در اسید آمینه سرین و نیمی دیگر علاوه بر آن در اسید آمینه ترئونین نیز متحمل تغییرات فسفوریلاسیون شدند. محور افقی نشانگر نام بروتئین و محور عمودی حاکی از تعداد اسید آمینه تغییر یافته پس از ترجمه در هر بروتئین است.

مطابق نتایج بدست آمده، پروتئین‌های متعلق به گروه ۶، شامل ApFAD-2 و ApFAD-6، در اسپیروولینا، ApFAD-4، در اسید آمینه سرین در ساختار خود متحمل تغییرات فسفوریلاسیون شدند. پروتئین ۱- ApFAD، به عنوان تنها عضو متعلق به کلاس بتاکاروتون هیدروکسیلاز، نیز دارای ۴ ناحیه فسفولیپید شده در اسید آمینه سرین در ساختار خود بود. این در حالیست که، تمامی پروتئین‌های متعلق به گروه آسیل-لیپید دساجوراز به همراه تنها یک عضو از پروتئین‌های اسفنگولیپید (ApFAD-4)، هم در اسید آمینه‌های سرین و هم ترئونین در ساختار خود، متحمل تغییرات فسفوریلاسیون شده بودند (جدول S1). بطور کلی، پروتئین‌های ApFAD متعلق به گروه‌های ApFAD-2 و ApFAD-6 (Omega ۶) و اسفنگولیپید (ApFAD-4 و ApFAD-8) دارای بیشترین فسفوریلاسیون در ساختار قابل ترجمه خود بودند، که این موضوع می‌تواند نقش این پروتئین‌ها را در ایجاد مقاومت به تنش‌های محیطی برجسته سازد (Kazanecki et al., 2007). این تغییرات پس از ترجمه در ساختار پروتئین‌ها رویدادهای پردازش کووالانسی هستند که خواص بیوفیزیکی یک پروتئین را از طریق افزودن یک گروه اصلاح‌کننده به یک یا چند اسید آمینه تغییر داده (Yan et al., 2014).

پیش‌بینی عناصر تنظیمی سیس در نواحی پرومتوتری ژن‌های *ApFAD* (Ramazi & Zahiri, 2021).

**پیش‌بینی عناصر تنظیمی سیس در نواحی پرومتوتری ژن‌های *ApFAD***

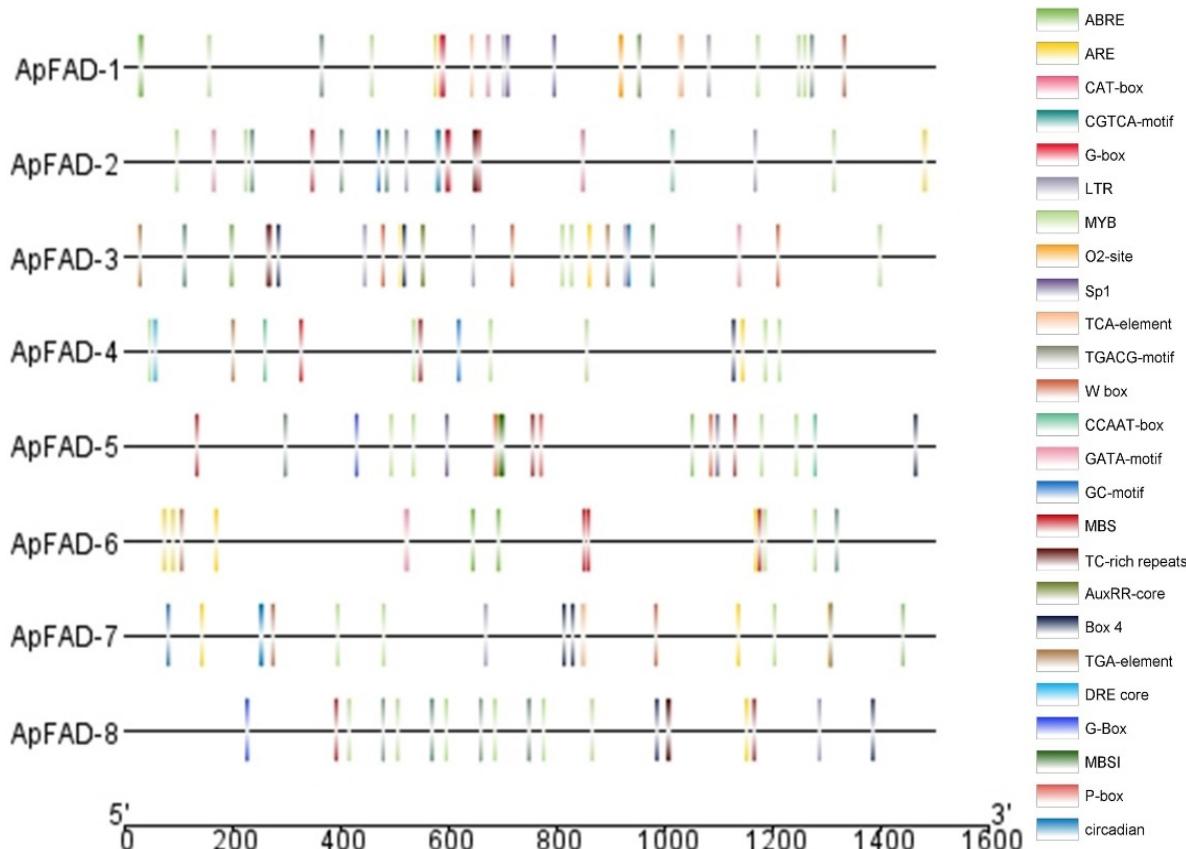
شناسایی عناصر تنظیم‌کننده سیس در نواحی پرومتوتری می‌تواند به درک عملکرد دقیق ژن‌ها کمک کرده و شبکه‌های تعاملی بین آن‌ها را نشان دهد؛ به طوری که پروتئین‌های مختلف در مواجهه با تنش‌های غیرزیستی، از طریق اتصال به عناصر عملکردی موجود در پرومتوتر ژن‌های هدف، آن‌ها را تنظیم می‌کنند (Cao et al., 2016). در مطالعه حاضر، نواحی پرومتوتری مربوط به ژن‌های *ApFAD* در ژنوم اسپیروولینا برای یافتن عناصر تنظیم‌کننده سیس مورد ارزیابی قرار گرفت. مطابق نتایج حاصل، انواع مختلفی از عناصر سیس برای مقابله با هورمون‌های مختلف و شرایط محرك، در ناحیه بالادرست ژن‌های *ApFAD* پیش‌بینی شدند (شکل ۷).

عناصر مشترک سیس در پرومتوتر، مانند عنصر هسته CAAT-box و TATA-box، در تمام ژن‌های *ApFAD* پیش‌بینی شدند، که تعداد این عناصر در ژن‌های *ApFAD*-

علاوه بر این، عناصر پاسخ دهنده به هورمون‌های جیرلین (AuxRR-core) در ApFAD-5 و اکسین (P-box) در ApFAD-3 و ApFAD-4 نیز پیش‌بینی شدند، که پتانسیل این ژن‌ها را در تعدل جنبه‌های مختلف رشد و نمو در اسپیروولینا آشکار می‌سازد (Soria-*et al.*, 2019).

عناصر پاسخگو به نور G-Box و Box\_4 در GATA-motif همه ژن‌های *ApFAD* یافت شدند، که احتمالاً به پتانسیل بالای این ژن‌ها در زمینه تولید متابولیت‌هایی مانند فلاونوئیدها، اشاره دارد. فاکتورهای سیس مختلفی، از قبیل LTR (دخیل در پاسخگویی به دماهای پایی)، MYB (دخیل در پاسخگویی به تنش‌های محیطی)، W-box (متصل شونده به پروتئین‌های WRKY) در راستای پاسخگویی به تنش‌های غیرزیستی)، TC-rich (دخیل در مکانیسم دفاعی و پاسخگویی به تنش‌ها) و MBS (دخیل در القای بیوستر فلاونوئیدها و محل اتصال پروتئین‌های MYB در جریان پاسخگویی به تنش خشک)، به عنوان عناصر تنظیمی دفاعی و دارای اهمیت فراوان، در ناحیه پروموتوری تمامی ژن‌های *ApFAD* پیش‌بینی شدند (شکل ۷).

۶. *ApFAD-4* و *ApFAD-7* به ترتیب متعلق به کلاسترها امگا، آسیل-لیپید و اسفنگولیپید، بیشتر بود که می‌تواند بیانگر پتانسیل بالای این ژن‌ها در تنظیم کارایی و صحت انجام رونویسی باشد (Tora & Timmers, 2010). عناصر مرتبط با هورمون‌ها، مانند ABRE (پاسخ‌دهنده به اسید آسیزیک)، CGTCA (عنصر پاسخ‌دهنده به متیل جاسمونات) و TCA-element (عنصر پاسخ‌دهنده به اسید سالیسیلیک)، تقریباً در همه پروموترا شناسایی شدند. تعدد و فراوانی تقریباً مشابه این عناصر پاسخگو به هورمون‌ها، در واقع بیانگر نقش مهم این ژن‌ها در تنظیم مراحل مختلف رشد و نمو و همچنین پاسخ به تنش‌های محیطی در ریزجلبک اسپیروولینا می‌باشد؛ به طور مثال، تمامی ژن‌های پیش‌بینی شده در کلاستر آسیل-لیپیدها در اسپیروولینا دارای عناصر سیس پاسخگو به هورمون‌هایی نظریتی متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک، اکسین و جیرلین بودند، که می‌تواند نشانگر اهمیت این ژن‌ها در مسیرهای سلولی مختلفی چون تنظیم رشد و ایجاد پاسخ مقاومتی در برابر تنش‌های محیطی باشد (Verma *et al.*, 2016).



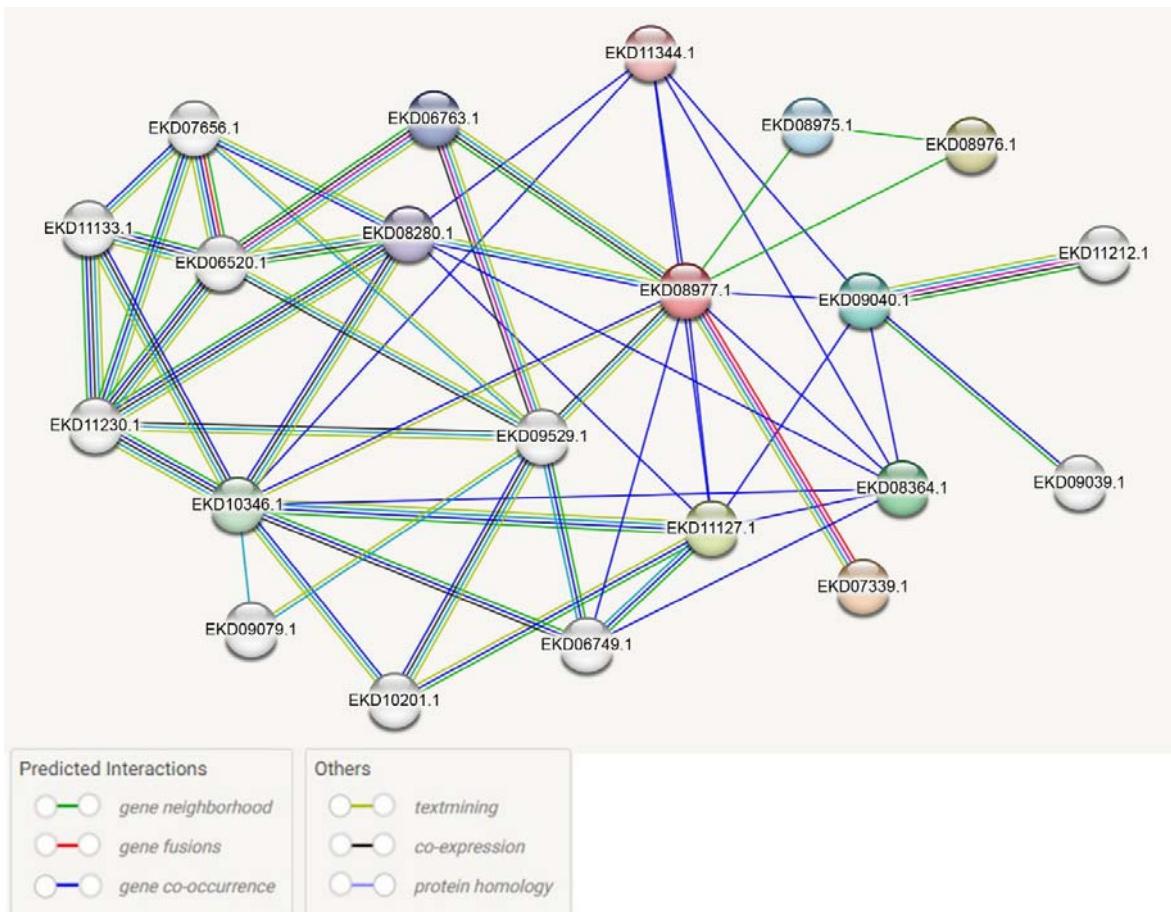
شکل ۷. عناصر سیس موجود در نواحی پروموتوری ژن‌های *ApFAD* در اسپیروولینا.

## بررسی شبکه‌های تعامل پروتئین-پروتئین برای ژن کاندید از خانواده *ApFAD* در اسپیرومیلینا

به دنبال استخراج اطلاعات کامل پروتئوم در *A. platensis* و با توجه به مشخصه‌های ساختاری و فیزیولوژیکی پیش‌بینی شده قابل توجه در توالی مربوط به ژن *ApFAD-6* در این مطالعه، پروتئین رمز شده توسط ژن مذکور به عنوان کاندیدی مناسب برای پیش‌بینی برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین در خانواده ژنی اسیدهای چرب دساقوراز در ریزجلبک اسپیرومیلینا، در نظر گرفته شد. بر اساس نتایج حاصل، پروتئین-6 (EKD08977.1) در شبکه پیش‌بینی شده، دارای تعامل نزدیکی با سایر پروتئین‌های اسید چرب دساقوراز، EKD08976.1، EKD09040.1، EKD07339.1، EKD07339.1 و EKD06763.1 می‌باشد، که این تعامل دارای پتانسیل تنظیم فعالیت‌های اکسیدورودکتازی، اتصال به یون‌های آهن، بیوسنتر لبید و گلیکوزیلاسیون لبیدها در سلول‌های اسپیرومیلینا می‌باشد (شکل ۸ و جدول S2). در واقع، تفسیر نتایج حاصل از آنالیز هستی‌شناسی ژنی این پروتئین‌های FAD در تعامل با یکدیگر، نقش مهم این برهم‌کنش‌ها را در توسعه فرآیند بیوسنتری اسیدهای چرب نشان می‌دهد (Kaur *et al.*, 2014). از دیگر پروتئین‌های دارای تعامل نزدیک با پروتئین FAD کاندید، می‌توان به Tic22-like (EKD08280.1) Lycopene cyclase، (EKD11344.1) Ubiquinone biosynthesis hydroxylase (EKD09529.1) Tocopherol (EKD10346.1) UbiA prenyltransferase (EKD11127.1) cyclase اشاره داشت، که به ترتیب در فرآیندهای انتقال پروتئین‌ها درون سلول، بیوسنتر متابولیت‌های ثانویه و تولید انرژی، تسهیل اتصال به دای‌نوكلئوتیدهای فلاوین آدنین و بیوسنتر بیوبیکوئینون، فعالیت پرینیل ترانسفرازی و بیوسنتر متابولیت‌های ثانویه توکوفرول، نقش دارند.

در شبکه پروتئینی پیش‌بینی شده برای پروتئین FAD کاندید، ژن‌هایی چون *hydroxyphenylpyruvate dioxygenase* (EKD10201.1) و *Molybdopterin oxidoreductase* (EKD11212.1)، که به واسطه فعالیت اکسیدورودکتازی خود به ساختارهای حاوی یون فلزی متصل شده و در تنظیم فرآیندهای متابولیکی اسید آمینه‌های آروماتیک و جذب نیترات نقش دارند، نیز پیش‌بینی شده است (شکل ۸ و جدول S2). علاوه بر این، پروتئینی از گروه Geranylgeranyl reductase (EKD11133.1) نیز دارای تعامل با پروتئین-6 *ApFAD* بود، که به نظر می‌رسد در فرآیند بیوسنتر کلروفیل و انتقال الکترون حین انجام فتوسنتز در اسپیرومیلینا دخیل باشد، که در نهایت می‌تواند رشد و بهره‌وری این ریزجلبک را تحت تاثیر قرار دهد (Wang *et al.*, 2014).

ژن‌های متعلق به گروه آسیل-لیپید دساقورازها، علاوه بر فاکتورهای پاسخگو به تنش‌های مختلف، دارای عناصر سیس پاسخگو به هورمون‌های متعدد و متفاوتی چون آسید سالیسیلیک، جیبرلین و اکسین، در ناحیه پرموموتری خود بودند، که وجه تمایز آن‌ها در مقایسه با سایر گروه‌های طبقه‌بندی بود و می‌تواند بیانگر پتانسیل قابل توجه این ژن‌ها در تنظیم مراحل مختلف رشد و نمو و نیز تحریک تولید متابولیت‌های مغذی در اسپیرومیلینا باشد (Lu *et al.*, 2020). همچنین، مطابق نتایج بدست آمده مشخص شد که ژن‌های *ApFAD* متعلق به کلاس اسفنگولیپیدها، علاوه بر تعداد قابل توجهی از عناصر تنظیم کننده پاسخ به محرك‌ها، دارای عناصر تنظیمی موثر در تحریک بیوسنتر فلاونوئیدها در سلول بودند؛ در واقع زمانی که اسپیرومیلینا در شرایط محیطی تنش‌زا قرار می‌گیرد، به واسطه دارا بودن پتانسیل تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف، از طریق تحریک بیان ژن‌هایی چون اسفنگولیپید دساقورازها، قادر است شرایط تنش را تحمل کند. علاوه بر این، ژن‌های *ApFAD-5* (از کلاس آسیل-لیپید دساقوراز) و *ApFAD-6* (متصل به گروه 6 Omega)، نیز دارای تعداد قابل توجهی از عناصر تنظیمی MBS در نواحی پرموموتری خود بودند، که نشان دهنده پتانسیل این ژن‌ها در تولید متابولیت‌های فلاونوئیدی و در نتیجه نقش پر رنگ آن‌ها در ایجاد ارزش غذایی بالا در اسپیرومیلینا می‌باشد (Kargiotidou *et al.*, 2008; Li-Beisson *et al.*, 2013). در واقع ترکیبات آنتی‌اسیدانی مختلف موجود در گیاهان و ریزجلبک‌های سبز خوراکی نقش ارزشمندی را در راستای کاهش یا جلوگیری از آسیب اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد، مانند رادیکال‌های سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و گونه‌های رادیکال غیرآزاد مانند پراکسیدهیدروژن، که می‌توانند باعث آسیب سلولی یا متابولیکی، تسریع پیری و یا حتی ایجاد سرطان شوند، ایفا می‌کنند. به عنوان یک منبع پروتئینی کامل، اسپیرومیلینا و ویژگی‌های آن بر جنبه‌های مختلف سلامت انسان، از سوءتعذیه گرفته تا پتانسیل آنتی‌اسیدانی تأثیر مثبت دارد (Kumar *et al.*, 2021; Maddaly, 2010). تنها عضو شناسایی شده از گروه بتاکاروتن هیدروکسیلаз در ژنوم اسپیرومیلینا نیز دارای فاکتورهای تنظیمی مختلفی هم در راستای تعديل رشد و نمو و هم در جهت تنظیم پاسخگویی به محرك‌های محیطی بود، که نشان دهنده دخالت بالقوه این ژن‌ها در جنبه‌های مختلف چرخه زندگی این ریزجلبک می‌باشد (شکل ۷).



شکل ۸. شبکه پروتئین-پروتئین پیش‌بینی شده بر اساس داده‌های پروتئومیکس ریزجلبک اسپیروولینا با استفاده از برنامه STRING.

ژن‌های *FAD* را در کنترل پاسخ به تنش‌های مختلف را نمایان سازد.

#### تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های *FAD* ارتوЛОگ بر اساس داده‌های RNA-seq

در مطالعه حاضر، با توجه به عدم ثبت داده‌های RNA-seq برای بیان تمامی ژن‌های اسپیروولینا در شرایط تنش‌های مختلف، از الگوی بیان نزدیک‌ترین ارتوЛОگ برای هر ژن *FAD* در *Arabidopsis ApFAD* و پروفایل بیانی ژن‌های *FAD* کاندید در شرایط تنش‌های مختلف شوری، خشکی، اکسیداتیو، سرما و اسموتیک مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نتایج بدست آمده، تمامی ژن‌های *FAD* در پاسخ به شرایط محرك دارای تغییرات واکنشی قابل توجهی در میزان بیان خود بودند (شکل ۹). بر اساس مقادیر FPKM استخراج شده، ژن‌های *AT4G30950* (نزدیک‌ترین *ApFAD-6*) از گروه ۶ Omega و *AT1G06080* (نزدیک‌ترین ارتوЛОگ برای *ApFAD-3*) متعلق

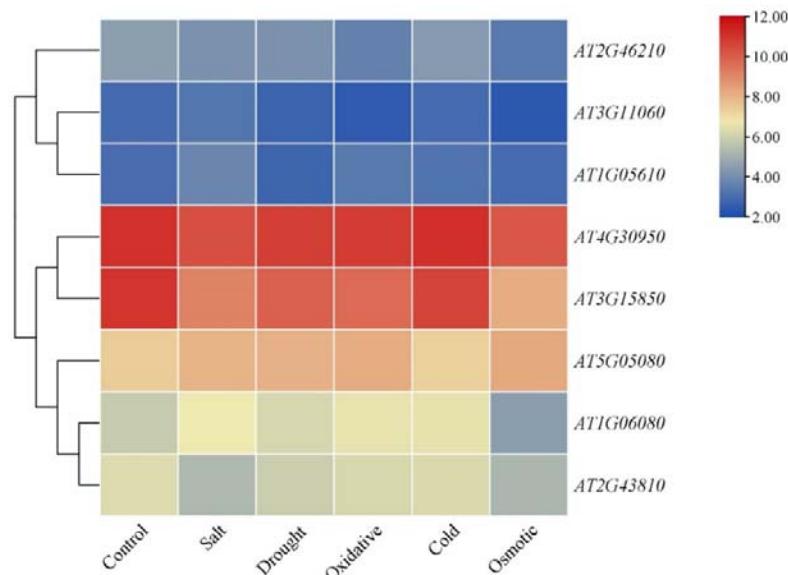
شایان توجه است که، تعداد زیادی از پروتئین‌های دارای Carotene 78-، از قبیل *ApFAD-6*, *Phytoene synthase* (EKD07656.1) desaturase Carotene isomerase (EKD06520.1) و *EKD11230.1*، نیز با فعالیت در مسیرهای کاتالیزوری و اکسیدوردوکتازی به بیوسنتز متabolیت‌های ارزشمندی چون کاروتونوئیدها در شبکه دساقورازی اسپیروولینا کمک می‌کنند؛ در واقع این پروتئین‌ها علاوه بر نقش آفرینی در مسیر تولید مواد معذی ارزشمند در اسپیروولینا، توانایی مقابله این ریزجلبک با عوامل متعدد محیطی را نیز تحت تاثیر مثبت Lee et al., 2016; Li-Beisson et al., 2013 قرار می‌دهند (همچنین، حضور پروتئین‌های Tocopherol O- methyltransferase (EKD06749.1) در شبکه پروتئینی مربوط به *ApFAD-6*، که وظیفه کنترل شبکه پروتئینی مربوط به *ApFAD-6*، در نهایت متیلاسیون پروتئین‌ها را بر عهده دارند، می‌تواند نقش برجسته شبکه‌های مرتبط با

(به ترتیب به عنوان نزدیکترین ارتو لوگ‌ها برای ژن‌های *Ap-4* و *FAD-8* از گروه اسفنگولیپیدهای *ApFAD-4* و *AT3G15850* (نزدیکترین ارتو لوگ برای ژن *5*) از گروه آسیل-لیپید دساقچورازها)، در مقایسه با شرایط کنترل، در شرایط تنش مختلف تغییری مشاهده نشد که می‌تواند نشان دهنده نقش تنظیم‌کنندگی عملکردی‌های سلولی این ژن‌ها در اسپیروولینا باشد.

در تحقیق دیگر نیز با وجود افزایش سطح بیان ژن *Δ9ACPCiFAD* در پاسخ به شرایط تنش در ریزجلبک *A12CiFAD*، میزان رونوشت ژن‌های *Chlamydomonas* sp. *Δ6CiFAD* و *ω3CiFAD2* طی ساعت‌های اولیه اعمال تنش تغییری نشان نداد (An et al., 2013). در واقع، ریزجلبک‌ها با تنظیم مسیر بیوسنتر لیپیدها، به تنش‌های مختلف پاسخ می‌دهند؛ تغییر در بیان ژن‌های *FAD* و تولید ترکیبات مختلف اسیدهای چرب در پاسخ به تنش‌های محیطی گزارش شده است (Liu et al., 2011). بر اساس یافته‌های حاصل از این مطالعه، دو ژن *ApFAD-3* و *ApFAD-6* به ترتیب از گروههای مربوط به *Omega 6* و آسیل-لیپید دساقچورازها، با توجه به مقادیر قابل توجه رونوشت آن‌ها و نیز در تکمیل نتایج حاصل از سایر آنالیزهای انجام شده در این مطالعه، از جمله بررسی تغییرات پس از ترجمه و نواحی پرمونتری، می‌توانند به عنوان کاندیدهای مناسب برای ارزیابی بیشتر پتانسیل آن‌ها در طول چرخه زندگی اسپیروولینا در نظر گرفته شوند.

به کلاستر آسیل-لیپید دساقچوراز، دارای بالاترین میزان رونویسی در شرایط تنش‌های مختلف بودند. شایان ذکر است که، بیان ژن‌های فوق الذکر تنها در شرایط تنش اسمزی (برای ژن *AT4G30950*) و سرما (برای ژن *50*) (*AT4G30950*)، در مقایسه با شرایط کنترل، پایین‌تر بود، که این نتایج با گزارشات سایر محققان مطابقت داشت (Liu et al., 2015). به علاوه، میزان رونویسی ژن *AT5G05080* (نزدیکترین ارتو لوگ برای *ApFAD-2*)، به عنوان یکی دیگر از ژن‌های *Omega* در این مطالعه، نیز دارای مقادیر قابل توجهی تحت تنش‌های مختلف به جز تنش سرما، در مقایسه با شرایط کنترل بود. در واقع، اسیدهای چرب دی‌نوئیک معمولاً توسط اسیدهای چرب به اسیدهای چرب تری‌نوئیک تبدیل می‌شوند و در نهایت اسید جاسمونیک (JA) تولید شده و تجمع آن در سلول‌ها می‌تواند سبب تحریک پاسخ موجود به شرایط تنش گردد (Im et al., 2002). همچنین، یکی دیگر از ژن‌های *AT1G05610* مربوط به گروه آسیل-لیپید دساقچورازها، (نزدیکترین ارتو لوگ برای *ApFAD-7*)، در پاسخ به تنش‌های شوری و اکسیداتیو، دارای مقادیر بیان بالاتر از نمونه کنترل بود، که با نتایج گزارش شده توسط سایر محققان مطابقت داشت (Tang et al., 2018).

بر اساس نتایج بدست آمده، در سطوح بیان ژن‌های *AT3G11060* (نزدیکترین ارتو لوگ برای ژن بتا-کاروتون *AT2G43810* و *AT2G46210* (*ApFAD-1*))، هیدروکسیلار



**شکل ۹.** نتایج حاصل از بررسی الگوی بیان نزدیکترین ارتو لوگ‌ها برای هر ژن *Arabidopsis ApFAD* در شرایط تنش‌های مختلف شوری، خشکی، اکسیداتیو، سرما و اسموتیک، در مقایسه با شرایط کنترل. در محور افقی تنش‌های محیطی و در محور عمودی کد دسترسی ژن‌های ارتو لوگ آورده شده است.

## نتیجه‌گیری و پیشنهادها

نتایج این مطالعه در زمینه بررسی ژن‌های خانواده *FAD* در ژنوم اسپیرولینا، می‌تواند به حصول درک صحیحی از مکانیسم‌های تنظیمی مولکولی مسیر غیراشباع‌سازی اسیدهای چرب در این ریزجلبک و همچنین سایر محصولات روغنی دارای اهمیت تجاری، نظری گیاهان روغنی، کمک کند. این مطالعه می‌تواند نقش کلیدی ژن‌های *FAD* را در رشد و نمو، تولید لیپیدها و متابولیت‌های مغذی و همچنین تحمل در برابر تنش‌های مختلف ژیستی/ غیرژیستی، در ریزجانداران و نیز گونه‌های ارزشمند گیاهی آشکار سازد. در ارزیابی‌های بیشتر، انجام مطالعات بیانی و بیش‌بیان هر یک از ژن‌های *FAD*، بهویژه از گروه Omega، می‌تواند مسیر را برای شناسایی عملکرددهای خاص و همچنین تنوع فعالیت کاتالیزوری با هدف افزایش میزان تولید اسیدهای چرب ارزشمند و نیز ارتقای مقاومت به تشخ‌ها در *A. platensis* و حتی گیاهان روغنی تجاری، هموار سازد.

این نتایج نشان می‌دهد که ژن‌های دساقوراز ممکن است در مسیرهای سیگنانلینگ تنش‌های شوری، خشکی و اکسیداتیو نقش داشته باشند و به واسطه تغییر نسبت محتوای اسیدهای چرب مختلف، نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های مذکور ایفا کنند (Zhiguo et al., 2019). تجمع مقداری بالای لیپید در گونه‌های مختلف ریزجلبک (*C. vulgaris*, *C. zofingiensis*, *Chlorella*, *C. protothecoides*) در شرایط تنش مختلف گزارش شده است. در واقع افزایش بیان ژن‌های *FAD* در کنار بیوسنتز متابولیت‌هایی مانند کاروتونوئیدها سبب افزایش توانایی Li et al., (2011) ارزیابی بیشتر ویژگی‌های عملکردی این ژن‌ها، به واسطه آزمایش‌هایی چون سنجش میزان بیان در شرایط محیطی مختلف و نیز آزمون‌های انتقال و بیش‌بیان ژنی، قابل دستیابی می‌باشد.

## References

- Abedi, E., & Sahari, M. A. (2014). Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food science & nutrition*, 2(5), 443-463.
- Alonso, D. L., Garcia-Maroto, F., Rodriguez-Ruiz, J., Garrido, J., & Vilches, M. (2003). Evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases. *Biochemical systematics and ecology*, 31(10), 1111-1124.
- An, M., Mou, S., Zhang, X., Zheng, Z., Ye, N., Wang, D., Zhang, W., & Miao, J. (2013). Expression of fatty acid desaturase genes and fatty acid accumulation in *Chlamydomonas* sp. ICE-L under salt stress. *Bioresource Technology*, 149, 77-83.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W., & Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research*, 37(suppl\_2), W202-W208.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., & Sonnhammer, E. L. (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic acids research*, 32(suppl\_1), D138-D141.
- Bationo, F., Savadogo, A., Kabore, D., Ouattara, L., Ouedraogo, H. G., Savadogo, B., & Traore, A. (2015). Storage influence on beta-carotene and alpha-tocopherol contents of solar-dried *Spirulina platensis* (*Spirulina*). *African journal of food Science*, 9(12), 546-554.
- Cao, J., Li, M., Chen, J., Liu, P., & Li, Z. (2016). Effects of MeJA on *Arabidopsis* metabolome under endogenous JA deficiency. *Scientific reports*, 6(1), 1-13.
- Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H. R., Frank, M. H., He, Y., & Xia, R. (2020). TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular plant*, 13(8), 1194-1202.
- Chen, C., Yang, J., Tong, H., Li, T., Wang, L., & Chen, H. (2019). Genome-wide analysis of fatty acid desaturase genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
- Chi, X., Yang, Q., Lu, Y., Wang, J., Zhang, Q., Pan, L., Chen, M., He, Y., & Yu, S. (2011). Genome-wide analysis of fatty acid desaturases in soybean (*Glycine max*). *Plant molecular biology reporter*, 29(4), 769-783.
- Choudhary, P., Nagar, R., Singh, V., Bhat, A. H., Sharma, Y., & Rao, A. (2019). ProGlycProt V2. 0, a repository of experimentally validated glycoproteins and protein glycosyltransferases of prokaryotes. *Glycobiology*, 29(6), 461-468.
- Ciferri, O., & Tiboni, O. (1985). The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. *Annual review of microbiology*, 39(1), 503-526.
- Connor, K. M., SanGiovanni, J. P., Lofqvist, C., Aderman, C. M., Chen, J., Higuchi, A., Hong, S., Pravda, E. A., Majchrzak, S., & Carper, D. (2007). Increased dietary intake of ω-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nature medicine*, 13(7), 868-873.
- de Jong, A., Pietersma, H., Cordes, M., Kuipers, O. P., & Kok, J. (2012). PePPER: a webserver for prediction of prokaryote promoter elements and regulons. *BMC genomics*, 13, 1-10.
- Díaz, M. L., Cuppari, S., Soresi, D., & Carrera, A. (2018). In silico analysis of fatty acid desaturase genes and proteins in grasses. *Applied biochemistry and biotechnology*, 184(2), 484-499.
- Diraman, H., Koru, E., & Dibeklioglu, H. (2009). Fatty acid profile of *Spirulina platensis* used as a food supplement.

- Domínguez, T., Hernández, M. L., Pennycooke, J. C., Jiménez, P., Martínez-Rivas, J. M., Sanz, C., Stockinger, E. J., Sánchez-Serrano, J. J., & Sanmartín, M. (2010). Increasing ω-3 desaturase expression in tomato results in altered aroma profile and enhanced resistance to cold stress. *Plant physiology*, 153(2), 655-665.
- The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. (2022). *Nucleic acids research*, 50(W1), W345-W351.
- Garcia-Hernandez, M., Berardini, T., Chen, G., Crist, D., Doyle, A., Huala, E., Knee, E., Lambrecht, M., Miller, N., & Mueller, L. A. (2002). TAIR: a resource for integrated *Arabidopsis* data. *Functional & integrative genomics*, 2, 239-253.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S. e., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server*. Springer.
- Hajiahmadi, Z., Abedi, A., Wei, H., Sun, W., Ruan, H., Zhuge, Q., & Movahedi, A. (2020). Identification, evolution, expression, and docking studies of fatty acid desaturase genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC genomics*, 21(1), 1-20.
- Hashiguchi, A., & Komatsu, S. (2016). Impact of post-translational modifications of crop proteins under abiotic stress. *Proteomes*, 4(4), 42.
- Hoiczyk, E. (2000). Gliding motility in cyanobacteria: observations and possible explanations. *Archives of microbiology*, 174, 11-17.
- Im, Y. J., Han, O., Chung, G. C., & Cho, B. H. (2002). Antisense expression of an *Arabidopsis* omega-3 fatty acid desaturase gene reduces salt/drought tolerance in transgenic tobacco plants. *Molecules and cells*, 13(2), 264-271.
- Jia, Y.-L., Wang, Y.-Z., Nong, F.-T., Ma, W., Huang, P.-W., & Sun, X.-M. (2022). Identification and characterization of fatty acid desaturases in *Schizochytrium* sp. HX-308. *Algal Research*, 67, 102861.
- Kanehisa, M. (2002). The KEGG database. 'In silico' simulation of biological processes: Novartis Foundation Symposium 247,
- Kargiotidou, A., Deli, D., Galanopoulou, D., Tsafaris, A., & Farmaki, T. (2008). Low temperature and light regulate delta 12 fatty acid desaturases (FAD2) at a transcriptional level in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Journal of experimental botany*, 59(8), 2043-2056.
- Kaur, N., Chugh, V., & Gupta, A. K. (2014). Essential fatty acids as functional components of foods-a review. *Journal of food science and technology*, 51(10), 2289-2303.
- Kazanecki, C. C., Uzwiak, D. J., & Denhardt, D. T. (2007). Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding. *Journal of cellular biochemistry*, 102(4), 912-924.
- Khan, Z., Bhadouria, P., & Bisen, P. (2005). Nutritional and therapeutic potential of Spirulina. *Current pharmaceutical biotechnology*, 6(5), 373-379.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.
- Kumar, V., Jaiswal, K. K., Tomar, M. S., Rajput, V., Upadhyay, S., Nanda, M., Vlaskin, M. S., Kumar, S., & Kurbatova, A. (2021). Production of high value-added biomolecules by microalgae cultivation in wastewater from anaerobic digestates of food waste: a review. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-18.
- Lee, J. M., Lee, H., Kang, S., & Park, W. J. (2016). Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. *Nutrients*, 8(1), 23.
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M. X., Arondel, V., Bates, P. D., Baud, S., Bird, D., DeBono, A., & Durrett, T. P. (2013). Acyl-lipid metabolism. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 11.
- Li, Y., Han, D., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2011). Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresource Technology*, 102(1), 123-129.
- Liu, J., Huang, J., Sun, Z., Zhong, Y., Jiang, Y., & Chen, F. (2011). Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 106-110.
- Liu, W., Li, W., He, Q., Daud, M. K., Chen, J., & Zhu, S. (2015). Characterization of 19 genes encoding membrane-bound fatty acid desaturases and their expression profiles in *Gossypium raimondii* under low temperature. *PLoS one*, 10(4), e0123281.
- Lomsadze, A., Gemayel, K., Tang, S., & Borodovsky, M. (2018). Modeling leaderless transcription and atypical genes results in more accurate gene prediction in prokaryotes. *Genome research*, 28(7), 1079-1089.
- Lu, J., Xu, Y., Wang, J., Singer, S. D., & Chen, G. (2020). The Role of Triacylglycerol in Plant Stress Response. *Plants (Basel)*, 9(4).
- Lupatini, A. L., Colla, L. M., Canan, C., & Colla, E. (2017). Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3), 724-732.
- Maddaly, R. (2010). The beneficial effects of spirulina focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties. *Nutr. Diet. Suppl.* 73. In.
- Mazo, V., Gmoshinskii, I., & Zilova, I. (2004). Microalgae Spirulina in human nutrition. *Voprosy pitaniia*, 73(1), 45-53.
- Michaelson, L. V., Zauner, S., Markham, J. E., Haslam, R. P., Desikan, R., Mugford, S., Albrecht, S., Warnecke, D., Sperling, P., & Heinz, E. (2009). Functional characterization of a higher plant sphingolipid Δ4-desaturase: defining the role of sphingosine and sphingosine-1-phosphate in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 149(1), 487-498.
- Miller, M. L., Soufi, B., Jers, C., Blom, N., Macek, B., & Mijakovic, I. (2009). NetPhosBac—a predictor for Ser/Thr phosphorylation sites in bacterial proteins. *Proteomics*, 9(1), 116-125.

- Moreno, P., Fexova, S., George, N., Manning, J. R., Miao, Z., Mohammed, S., Muñoz-Pomer, A., Fullgrabe, A., Bi, Y., & Bush, N. (2022). Expression Atlas update: gene and protein expression in multiple species. *Nucleic acids research*, 50(D1), D129-D140.
- Nilamyani, A. N., Aulia, F. N., Moni, M. A., Shoombuatong, W., Hasan, M. M., & Kurata, H. (2021). PredNTS: improved and robust prediction of nitrotyrosine sites by integrating multiple sequence features. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2704.
- Offermanns, S. (2017). Hydroxy-carboxylic acid receptor actions in metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(3), 227-236.
- Racine, R. A., & Deckelbaum, R. J. (2007). Sources of the very-long-chain unsaturated omega-3 fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 10(2), 123-128.
- Ramazi, S., & Zahiri, J. (2021). Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database*, 2021, baab012.
- Rao, P. K., Roxas, B. A., & Li, Q. (2008). Determination of global protein turnover in stressed mycobacterium cells using hybrid-linear ion trap-fourier transform mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 80(2), 396-406.
- Ratledge, C., & Wynn, J. P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in applied microbiology*, 51, 1-52.
- Schuchardt, J. P., Huss, M., Stauss-Grabo, M., & Hahn, A. (2010). Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for the development and behaviour of children. *European journal of pediatrics*, 169, 149-164.
- Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P., & Bork, P. (2000). SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic acids research*, 28(1), 231-234.
- Singh, A. K., Fu, D.-Q., El-Habbak, M., Navarre, D., Ghabrial, S., & Kachroo, A. (2011). Silencing genes encoding omega-3 fatty acid desaturase alters seed size and accumulation of Bean pod mottle virus in soybean. *Molecular plant-microbe interactions*, 24(4), 506-515.
- Soria-García, Á., Rubio, M. C., Lagunas, B., López-Gomollón, S., Luján, M. d. I. Á., Díaz-Guerra, R., Picorel, R., & Alfonso, M. (2019). Tissue distribution and specific contribution of *Arabidopsis* FAD7 and FAD8 plastid desaturases to the JA-and ABA-mediated cold stress or defense responses. *Plant and Cell Physiology*, 60(5), 1025-1040.
- Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N. T., Roth, A., & Bork, P. (2016). The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic acids research*, gkw937.
- Tang, W., Ouyang, C., Liu, L., Li, H., Zeng, C., Wang, J., Fu, L., Wu, Q., Zeng, B., & He, B. (2018). Genome-wide identification of the fatty acid desaturases gene family in four *Aspergillus* species and their expression profile in *Aspergillus oryzae*. *AMB Express*, 8(1), 169.
- Tonon, T., Sayanova, O., Michaelson, L. V., Qing, R., Harvey, D., Larson, T. R., Li, Y., Napier, J. A., & Graham, I. A. (2005). Fatty acid desaturases from the microalga *Thalassiosira pseudonana*. *The FEBS journal*, 272(13), 3401-3412.
- Tora, L., & Timmers, H. T. M. (2010). The TATA box regulates TATA-binding protein (TBP) dynamics in vivo. *Trends in biochemical sciences*, 35(6), 309-314.
- Umarov, R. K., & Solovyev, V. V. (2017). Recognition of prokaryotic and eukaryotic promoters using convolutional deep learning neural networks. *PloS one*, 12(2), e0171410.
- Van Tuerenhout, D. R. (2005). *The Aztecs: new perspectives*. Bloomsbury Publishing USA.
- Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC plant biology*, 16, 1-10.
- Wan, D., Wu, Q., & Kuča, K. (2021). Spirulina. In *Nutraceuticals* (pp. 959-974). Elsevier.
- Wang, P., Li, C., Wang, Y., Huang, R., Sun, C., Xu, Z., Zhu, J., Gao, X., Deng, X., & Wang, P. (2014). Identification of a geranylgeranyl reductase gene for chlorophyll synthesis in rice. *Springerplus*, 3, 1-9.
- Wu, T., Yu, L., Zhang, Y., & Liu, J. (2021). Characterization of fatty acid desaturases reveals stress-induced synthesis of C18 unsaturated fatty acids enriched in triacylglycerol in the oleaginous alga *Chromochloris zofingiensis*. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 184.
- Yan, Y., Jiang, J.-Y., Fu, M., Wang, D., Pelletier, A. R., Sigdel, D., Ng, D. C. M., Wang, W., & Ping, P. (2023). MIND-S is a deep-learning prediction model for elucidating protein post-translational modifications in human diseases. *Cell Reports Methods*, 3(3), 100430.
- Yu, C.-S., Cheng, C.-W., Su, W.-C., Chang, K.-C., Huang, S.-W., Hwang, J.-K., & Lu, C.-H. (2014). CELLO2GO: a web server for protein subCELLular LOcalization prediction with functional gene ontology annotation. *PloS one*, 9(6), e99368.
- Zárate, R., el Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N., Pérez, J. A., & Rodríguez, C. (2017). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and translational medicine*, 6, 1-19.
- Zhao, Q., Xie, Y., Zheng, Y., Jiang, S., Liu, W., Mu, W., Liu, Z., Zhao, Y., Xue, Y., & Ren, J. (2014). GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic acids research*, 42(W1), W325-W330.
- Zhiguo, E., Chen, C., Yang, J., Tong, H., Li, T., Wang, L., & Chen, H. (2019). Genome-wide analysis of fatty acid desaturase genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Scientific reports*, 9(1), 19445.