

مطالعه *in silico* خانواده ژنی پلی آمین اکسیداز (PAO) در انگور

In silico study of polyamine oxidase (PAO) gene family in grape

امین عابدی^۱، محمدمهدی سوهانی^{۲*}، رضا شیرزادیان خرم‌آباد^۳
Amin Abedi, Mohammad Mehdi Sohani*, Reza Shirzadian-Khoramabad

۱- دکترای بیوتکنولوژی کشاورزی، ۲- دانشیار ۳- استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی
دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران

Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture Science, University of
Guilan, Rasht, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: msohani@guilan.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۱۹)

چکیده

پلی آمین اکسیدازها (PAO) آنزیم‌های وابسته به فلاوین آدنین دی‌نوکلوئید هستند که در کاتابولیسم پلی آمین‌ها در پراکسی‌زوم، آپوپلاست و سیتوپلاسم نقش دارند. گزارش‌های زیادی در زمینه اهمیت ژن‌های PAO گیاهان در پاسخ به تنش‌ها ارائه شده است با این حال مطالعه جامعی در مورد تعداد، روابط تکاملی، ساختار ژنی و الگوی بیان ژن‌های PAO در انگور موجود نیست. در مطالعه حاضر با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی، هشت ژن محتمل PAO (*VvPAO1*-*VvPAO8*) در ژنوم انگور 12X شناسایی شد. بر اساس مطالعه فیلوژنتیکی ژن‌های *VvPAO* به سه گروه تقسیم می‌شوند که هر گروه از نظر جایگاه سلولی و کارکرد اختصاصی است. ژن‌های *VvPAO* دارای صفر تا ۹ اینترون می‌باشند و بر روی ۶ کروموزوم از ۱۹ کروموزوم انگور قرار گرفته‌اند. وجود چندین عنصر تنظیمی *cis* پاسخ به تنش‌ها و هورمون‌ها در پیش‌ر این ژن‌ها دلالت بر نقش احتمالی آن‌ها در پاسخ به تنش‌ها دارد. بررسی داده‌های ریزآرایه ژن‌های اورتولوگ PAO انگور در آرکیدوپسیس در شرایط تنش‌های غیر زیستی نشان داد که سطح رونویسی این ژن-ها در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی افزایش می‌یابد که نشان دهنده نقش این ژن‌ها در پاسخ انگور به تنش‌ها است. نتایج این مطالعه داده‌های پایه برای پژوهش‌های بیشتر در مورد نقش ژن‌های PAO در انگور را فراهم می‌سازد.

واژه‌های کلیدی

بررسی فیلوژنتیکی،
بیان ژن،
بیوانفورماتیک،
پلی آمین،
تنش غیر زیستی

پلی آمین ها در فرایندهای زیستی نظیر جنین زایی، بافت زایی، رسیدن میوه، مرگ برنامه ریزی شده سلول، گلدهی و پیری نقش دارند (Liu et al. 2015). افزایش تجمع پلی آمین ها در گیاهان در شرایط تنش های غیر زیستی در گونه های مختلف گیاهی گزارش شده است (Groppa and Benavides, 2008). در بسیاری از تنش ها فقط سطح یک نوع از پلی آمین ها افزایش می یابد. برای مثال زمانی که کالوس سیب تحت تیمار شوری قرار می گیرد سطح پوترسین افزایش می یابد (Liu et al. 2006)، در حالی که تنش شوری موجب افزایش اسپرمیدین و اسپرمین در انگور می شود (Ikbali et al. 2014).

فعالیت پلی آمین ها به ماهیت کاتیونی آنها نسبت داده می شود که بر اساس آن توانایی اتصال به تمامی ملکول دارای بار منفی سلول نظیر DNA، RNA، پروتئین و فسفولیپید را داشته و بر روی بیان ژن، سنتز و کارکرد پروتئین و تنظیم کانال های یونی تاثیر گذار هستند (Kusano et al. 2008). حفظ هموستازی پلی آمین ها در سلول برای انجام این فرایندها ضروری است اما غلظت بالای پلی آمین می تواند برای سلول سمی بوده و بنابراین شدیداً میزان PA آزاد سلول کنترل می شود. غلظت پلی آمین آزاد داخل سلول از طریق اتصال آن با ترکیباتی نظیر هیدروکسی-سینامیک اسید، همی سلولوز، لیگنین و نیز کاتابولیسم پلی آمین ها کنترل می شود (Moschou et al. 2008).

دو آنزیم اصلی کاتابولیسم پلی آمین ها دی آمین اکسیداز (DAO, EC 1.4.3.6) و پلی آمین اکسیداز (PAO, EC 1.5.3.3) هستند که به ترتیب از کوفاکتورهای مس و FAD برای فعالیت آنزیمی استفاده می کنند. آنزیم DAO در دامیناسیون اکسیداتیو پوترسین و آنزیم PAO در دامیناسیون اکسیداتیو اسپرمیدین و اسپرمین نقش دارند (Fincato et al. 2011). آنزیم های PAO بر اساس کارکرد و جایگاه فعالیت به سه گروه تقسیم می شود. گروه یک واکنش نهایی کاتابولیسم پلی آمین ها در آپوپلاست را کاتالیز کرده و باعث تولید ۴-آمینوبوتانال و یا (۳-آمینوپروپیل)-۴-آمینوبوتانال همراه با ۱،۳-دی آمینوپروپان و H_2O_2 می شود (Cervelli et al. 2006). گروه دوم شامل آنزیم های PAO

گیاهان دائماً با شرایط محیطی نامناسب نظیر شوری، سرما، دمای بالا و خشکی روبرو هستند. نتیجه این تنش ها تاخیر در رشد و نمو و کم شدن تولید و در برخی موارد مرگ گیاه است. بر این اساس درک چگونگی سازگاری گیاهان و زنده ماندن آنها در شرایط تنش برای بهره برداری کارآمد از ذخائر ژنتیکی دارای تحمل بالا نسبت به تنش ها و توسعه روش های جدید برای افزایش تحمل گیاهان در واکنش به شرایط نامناسب محیطی ضروری است (Liu et al. 2015).

تکامل گیاهان همراه با ایجاد و توسعه سیستم های پیچیده و بسیار هماهنگ پیام رسانی است که اجازه سازگاری گیاهان به تنش ها را می دهد (Gehan et al. 2015). به اختصار این مسیر پیام رسانی شامل درک پیام ها بوسیله گیرنده های موجود بر روی غشای پلاسمایی و به دنبال آن تولید پیام رسان های ثانوی نظیر کلسیم، گونه های فعال اکسیژن و اینوزیتول فسفات ها هستند. پیام رسان های ثانوی پروتئین های پایین دست مسیر نظیر کینازها و فسفاتازها را فعال می کنند که آنها نیز موجب فعال شدن فاکتور های رونویسی می شوند (Danquah et al. 2014; Ma et al. 2015). فاکتورهای رونویسی با اتصال به عناصر تنظیمی cis ناحیه پیشبر ژن های پاسخ به تنش موجب فعال شدن آنها و در نتیجه پاسخ گیاه می شوند (Liu et al. 2014).

ژن های پاسخ به تنش موجب تولید ترکیباتی نظیر اسمولیت ها می شوند. اسمولیت ها گروه کوچکی از ترکیبات ارگانیک هستند که در پاسخ به تنش های محیطی در گیاه تجمع می یابند. اسمولیت های مهم سلولی شامل پرولین، گلايسین بتائین و پلی آمین ها (PA) هستند. پلی آمین ها مولکول های پلی کاتیونی آلفاتیک با وزن مولکولی کم هستند که در گیاهان، جانوران و باکتری ها یافت می شوند. سه گروه اصلی این ترکیبات در گیاهان شامل پوترسین دی آمین (Put)، اسپرمیدین تری آمین (Spd) و اسپرمین (Spm) هستند. اگرچه پلی آمین هایی نظیر کاداورین و همواسپرمین نیز در گیاهان وجود دارد (Sengupta et al. 2016; Ramgan et al. 2014).

روابط فیلوژنتیکی آن با ژنهای PAO آراییدوپسیس و برنج بررسی شد. همچنین وزن مولکولی، جایگاه سلولی، pH ایزوالکتریک، جایگاه موتیفها بر روی پروتئین، ساختار ژنی و عناصر تنظیمی cis ناحیه پیشبر آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت برای درک بیشتر کارکرد ژنهای PAO انگور بیان ژنهای همولوگ آنها در آراییدوپسیس در واکنش به تنشهای غیر زیستی بر اساس دادههای ریزآرایه بررسی شد.

مواد و روشها

شناسایی اعضاء خانواده ژنی PAO در انگور

فرآیند شناسایی اعضاء خانواده ژنی PAO در انگور، توالی پروتئینی ژنهای PAO برنج (Liu et al. 2014) و آراییدوپسیس (Takahashi et al. 2010) به ترتیب با استفاده از ۲ پایگاه داده RGAP7 و TAIR10 دریافت و از روش tBLASTn جهت جستجوی ژنهای PAO در پایگاه داده ژنوم انگور در سایت فایتوزوم استفاده شد (Goodstein et al. 2012).

پس از دریافت تمام توالیها، توالیهای تکراری حذف و در نهایت تائید وجود دومین Amino_oxidase (PF01593) در توالیهای شناسایی شده با استفاده از پایگاه داده CDD انجام گرفت (Marchler-Bauer et al. 2014). آدرس اینترنتی پایگاههای استفاده شده در این پژوهش در جدول ۱ ارائه شده است.

وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک تئوریتیکال پروتئینهای PAO با استفاده از ابزار ProtParam سایت ExPASy محاسبه شد (Artimo et al. 2012). برای شناسایی جایگاه سلولی پروتئینها از برنامه برخط ProtComp استفاده شد. در نامگذاری ژنهای PAO انگور، ابتدا پسوند Vv از Vitis vinifera و سپس PAO و در نهایت شماره گذاری بر اساس جایگاه ژنها بر روی کروموزومهای ۱ تا ۱۹ و از بالا به پایین انجام گرفت.

واکنش برگشتی جهت تبدیل پلی آمینها به یکدیگر بوده و ابتدا در پستانداران شناسایی شدند. این آنزیمها توانایی تبدیل اسپرمین به اسپرمیدین و همچنین اسپرمیدین به پوترسین را داشته و در پراکسی زوم فعالیت می کنند (Tavladoraki et al. 2006). گروه سوم شامل آنزیمهایی است که با وجود داشتن دمین Amino_oxidase (PF01593) قادر به دامیناسیون پلی آمینها نبوده و در فرآیند تغییرات پس از ترجمه هیستونها در هسته نقش دارند. پروتئینهای PAO گروه سه همچنین دارای دمین SWIRM (PF04433) هستند که در میانکشی پروتئین-پروتئین نقش دارد (Shibaya et al. 2016).

بر اساس مطالعات، فعالیت آنزیم PAO در رشد و نمو و نیز پاسخ گیاه به تنشها نقش دارد. بعنوان مثال مشخص شده است که PAO در تقویت دیواره سلولی، رشد مزوکوتیل و نیز مرگ برنامه ریزی شده سلول نقش دارد (Moschou et al. 2008, 2012). در گیاه توتون تحت تنش شوری، H_2O_2 تولید شده در اثر کاتابولیسم پلی آمین اسپرمیدین بوسیله آنزیم PAO در آپوپلاست بعنوان یک پیام رسان عمل کرده و بیان ژنهای دفاعی را القاء می کند. همچنین H_2O_2 تولید شده بوسیله فعالیت آنزیمی PAO موجب فعال شدن MAPKها شده و باعث افزایش مقاومت گیاه در برابر پاتوژن ها می شود.

آنزیمهای PAO بوسیله یک خانواده ژنی کوچک چند عضوی کد می شوند. بعنوان مثال آراییدوپسیس و برنج به ترتیب دارای ۵ و ۷ ژن PAO هستند (Liu et al. 2010; Takahashi et al. 2014). همچنین ۶ ژن PAO در گیاه پرتقال (Citrus sinensis) شناسایی شده است (Wang and Liu, 2014). انگور (Vitis vinifera L.) از مهمترین گیاهان باغی است که تنشهای زیستی و غیر زیستی بر روی کیفیت و کمیت محصول آن تاثیر منفی دارند. با توجه به نقش آنزیمهای PAO در مقاومت گیاهان نسبت به تنشها، مطالعه کارکردی پلی آمین اکسیدازها می تواند راهکاری جدید برای تولید گیاهان مقاوم به تنش باشد. توالی یابی ژنوم انگور این فرصت را مهیا کرده است تا اعضاء خانواده ژنی PAO در این گیاه شناسایی و مطالعه شوند. در این مطالعه بر اساس جستجوی پایگاه داده ژنوم انگور، ۸ ژن PAO شناسایی و

جدول ۱- اسامی و آدرس پایگاه داده‌های استفاده شده در این پژوهش

Table 2- Name and URL address of the databases exploited in the current research

پایگاه داده	URL
RGAP7	http://rice.plantbiology.msu.edu/
TAIR10	http://www.arabidopsis.org/
Phytozome	https://phytozome.jgi.doe.gov/
Conserved domain database	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi
Expasy	http://web.expasy.org/compute_pi/
GSDS	http://gsds.cbi.pku.edu.cn/
MEME	http://meme-suite.org/
Pfam	http://pfam.xfam.org/
SMART	http://smart.embl-heidelberg.de/
PlantCare	http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/
Gene Expression Omnibus	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی خانواده ژنی PAO در انگور

بررسی روابط تکاملی بین اعضاء یک خانواده ژنی نیازمند همردیف سازی صحیح و رسم درخت فیلوژنتیکی با الگوریتم مناسب است. برای رسم درخت فیلوژنتیکی، از توالی حفاظت شده دمین *Amino_oxidase* در برنج، آرابیدوپسیس و انگور استفاده شد. همردیف سازی پروتئین‌ها با استفاده از نرم افزار ClustalX 2.0.8 (Larkin et al. 2007) و رسم درخت فیلوژنتیکی با نرم افزار MEGA7 (Kumar et al. 2016) بر اساس روش neighbor joining (N.J) و آزمون بوت استرپ (Felsenstein, 1985) با تکرار ۱۰۰۰ انجام شد.

تجزیه و تحلیل ساختار اگزون- اینترونی و شناسایی موتیف- های حفاظت شده

الگوی توزیع اینترون‌ها از طریق مقایسه توالی CDS نسبت به DNA ژنومی مربوط به هر ژن با استفاده از سرور GSDS انجام گرفت (Hu et al. 2015). برای شناسایی موتیف- های اختصاصی این خانواده از MEME استفاده شد (Bailey et al. 2006). پارامترهای مورد استفاده شامل تعداد موتیف‌ها ۱۰ عدد و کمترین و بیشترین طول موتیف‌ها به ترتیب ۶ و ۵۰ اسید آمینه بود. پایگاه داده Pfam و برنامه SMART برای بررسی موتیف‌های شناسایی شده استفاده شد (Finn et al. 2013; Letunic et al. 2012).

بررسی ناحیه پیشبر خانواده ژنی PAO انگور

وجود عناصر cis مختلف در ناحیه تنظیمی هر ژن نقش مهمی در پاسخ ژن به محرک‌های محیطی و زیستی دارد. بنابراین بررسی پیشبر خانواده ژنی PAO در انگور می‌تواند در درک الگوی بیان و کارکرد این ژن‌ها در شرایط زیستی مفید باشد. برای شناسایی عناصر تنظیمی ناحیه پیشبری ژن‌های VvPAO ۱۵۰۰ جفت باز توالی DNA ژنومی بالا دست کدون شروع (ATG) ژن- ها (Zhou et al. 2016) از سایت فایتوزوم (Goodstein et al. 2012) دریافت و شناسایی عناصر تنظیمی مربوط به تنش‌ها و پاسخ به هورمون‌ها با استفاده از وبسایت PlantCARE انجام شد (Lescot et al. 2002).

الگوی بیان ژن‌های PAO در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی در آرابیدوپسیس

بررسی پروفایل بیانی خانواده ژنی PAO آرابیدوپسیس در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی شوری، خشکی، سرما و اسمزی با استفاده از داده‌های ریزآرایه Affymetrix Arabidopsis ATH1 Genome Array موجود در بانک اطلاعاتی NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) انجام شد (Barrett et al. 2013). شماره دسترسی داده‌های مربوط به این تنش‌ها در GEO شامل شوری (GSE5623)، خشکی (GSE5624)، اسمزی (GSE5622)، سرما (GSE5621) و کنترل (GSE5620) است. داده‌های خام با

فرمت CEL با استفاده از نرم افزار RMAExpress به روش RMA و بر مبنای $\log_2$ نرمال شدند. پروب ست ID اختصاصی ژنهای *AtSSL* با استفاده از ابزار Probe Match سایت affymetrix دریافت و از آن برای استخراج داده‌های لگاریتمی شدت سیگنال ژنهای *AtPAO* برای مطالعه‌های بیشتر استفاده شد. خوشه بندی داده‌های بیانی بر اساس روش اقلیدسی و الگوریتم Complete Linkage و رسم نقشه حرارتی (Heat Map) با استفاده از نرم افزار Mev4.0 انجام شد. در صورتی تغییرات بیان معنی‌دار در نظر گرفته شدند که چند برابر بیان ژن‌ها در شرایط تنش نسبت به کنترل بیشتر از ۱ یا کمتر از ۱- بود (Tripathi et al. 2015).

نتایج و بحث

شناسایی اعضاء خانواده ژنی PAO انگور

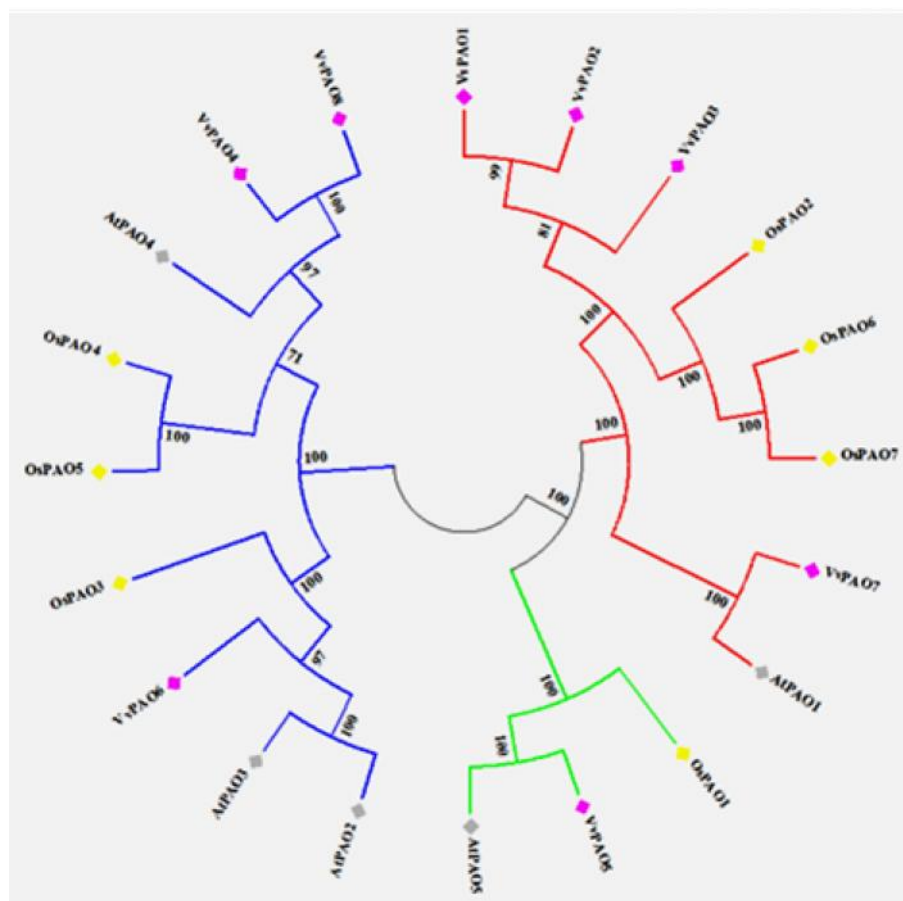
جهت شناسایی ژنهای PAO در ژنوم انگور، از الگوریتم tBLASTn توالی‌های پروتئینی PAO برنج و آرابیدوپسیس در پایگاه داده ژنوم انگور استفاده شد. بر این اساس پس از حذف توالی‌های تکراری، ۱۳ توالی پروتئینی شناسایی شد. بررسی وجود دمین *Amino_oxidase* نشان داد که هر ۱۳ ژن دارای این دمین هستند. با این حال توالی پروتئینی ژن‌های به شماره دسترسی GSVIVG01015722001، GSVIVG01016218001، GSVIVG01014417001 و GSVIVT01009834001 در پایگاه داده فایتوزوم علاوه بر دمین *Amino_oxidase* دارای دمین SWIRM نیز بودند. پروتئین‌های دارای دمین‌های *Amino_oxidase* و SWIRM هیستون دمتیلاز اختصاصی لایزین (Lysine specific histone demethylase) نامیده می‌شوند که موجب تغییرات پس از ترجمه در هیستون‌ها شده و در بسیاری از فرآیندهای زیستی گیاه نظیر گلدهی، پاسخ دفاعی و فعالیت براسینواستروئیدها نقش دارند (Parkash et al. 2014). همچنین ژن به شماره دسترسی GSVIVT01013730001 با وجود داشتن دمین *Amino_oxidase* بعلت کوتاه بودن پروتئین و ناقص بودن

دمین کارکردی از بررسی‌های بعدی حذف شد زیرا عموماً توالی-ها و دمین‌های ناقص بررسی‌های فیلوژنتیکی را با مشکل روبرو می‌سازند (Jiang et al. 2010). در نهایت هشت ژن PAO شناسایی شده در ژنوم انگور بر اساس جایگاه کروموزومی از *VvPAO1* تا *VvPAO8* نامگذاری شدند (جدول ۲). این شیوه نامگذاری بیشتر در مورد پروتئین‌های NAC سبب زمینی، WRKY ذرت، NCX آرابیدوپسیس و برنج نیز استفاده شده است (Singh et al. 2013; Wei et al. 2012; Singh et al. 2015). هشت ژن PAO شناسایی شده انگور سه ژن *VvPAO1*، *VvPAO2* و *VvPAO3* بر روی کروموزوم یک و ژن‌های *VvPAO4*، *VvPAO5*، *VvPAO6*، *VvPAO7* و *VvPAO8* به ترتیب بر روی کروموزوم‌های ۴، ۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۷ قرار دارند (جدول ۲). مطالعات فیزیک شیمیایی این خانواده ژنی با استفاده از ابزار تجزیه و تحلیل پروتئین ExPASy (Artimo et al. 2012) نشان داد که این ژن‌ها از نظر تعداد آمینو اسید، وزن مولکولی و pI باهم تفاوت دارند. طول پروتئین‌های این خانواده از ۲۵۵ تا ۵۰۵ اسید آمینه و وزن مولکولی آن‌ها از ۲۹/۱۱ تا ۵۶/۶۶ کیلودالتون است. دامنه pH ایزوالکتریک این پروتئین‌ها از ۵/۳۱ در *VvPAO7* تا ۹/۱۶ در *VvPAO3* است. مکانیابی پروتئین‌ها *VvPAO* مشخص کرد که این پروتئین‌ها در آپوپلاست، سیتوپلاسم و پراکسی‌زوم فعال هستند (جدول ۲). مطالعات نشان داده است که جایگاه سلولی آنزیم‌های PAO با کارکرد آن‌ها در ارتباط است. آنزیم‌های PAO سیتوپلاسمی و پراکسی‌زومی در واکنش تبدیل برگشتی (تبدیل اسپرمین به اسپرمیدین و اسپرمیدین به پوترسین) و آنزیم-های PAO آپوپلاستی در واکنش نهایی کاتابولیسم پلی‌آمین‌ها نقش دارند (Chen et al. 2016).

جدول ۲- ویژگی‌های خانواده ژنی PAO در انگور

Table 2- Information of PAO gene family in grape

نام ژن در فایتوزوم	ژن	کروموزوم	طول پروتئین (اسید آمینه)	pH ایزوالکتریک	وزن مولکولی (کیلو دالتون)	جایگاه سلولی
GSVIVG01013726001	VvPAO1	chr1	495	5.97	55.222	آپوپلاست
GSVIVG01013729001	VvPAO2	chr1	505	5.69	56.662	آپوپلاست
GSVIVG01013732001	VvPAO3	chr1	489	9.16	54.526	آپوپلاست
GSVIVG01026304001	VvPAO4	chr4	490	5.67	54.204	پراکسی زوم
GSVIVG01015201001	VvPAO5	chr11	474	5.56	51.927	سیتوپلاسم
GSVIVG01020812001	VvPAO6	chr12	490	5.47	54.782	پراکسی زوم
GSVIVG01032163001	VvPAO7	chr13	503	5.31	56.049	آپوپلاست
GSVIVG01029406001	VvPAO8	chr17	255	5.41	29.110	پراکسی زوم



شکل ۱- رابطه فیلوژنتیکی پروتئین‌های PAO انگور، برنج و آرابیدوپسیس. هم ردیف سازی چندگانه دمین PAO با نرم افزار ClustalX انجام و درخت به کمک نرم افزار MEGA7 بر اساس روش اتصال همسایه‌ها با بوت‌استرپ هزار رسم شد. گروه‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب با رنگ‌های قرمز، سبز و آبی مشخص شده‌اند. پروتئین‌های PAO انگور، برنج و آرابیدوپسیس به ترتیب با رنگ‌های صورتی، زرد و خاکستری نشان داده شده است.

Figure 1- Phylogenetic relationships among grape, Arabidopsis and rice PAO proteins. Multiple sequence alignment of PAO domain was done using ClustalX and the phylogenetic tree was generated using MEGA7 software by the Neighbor-joining method with 1000 bootstrap replicates

بررسی روابط تکاملی خانواده ژنی PAO در انگور

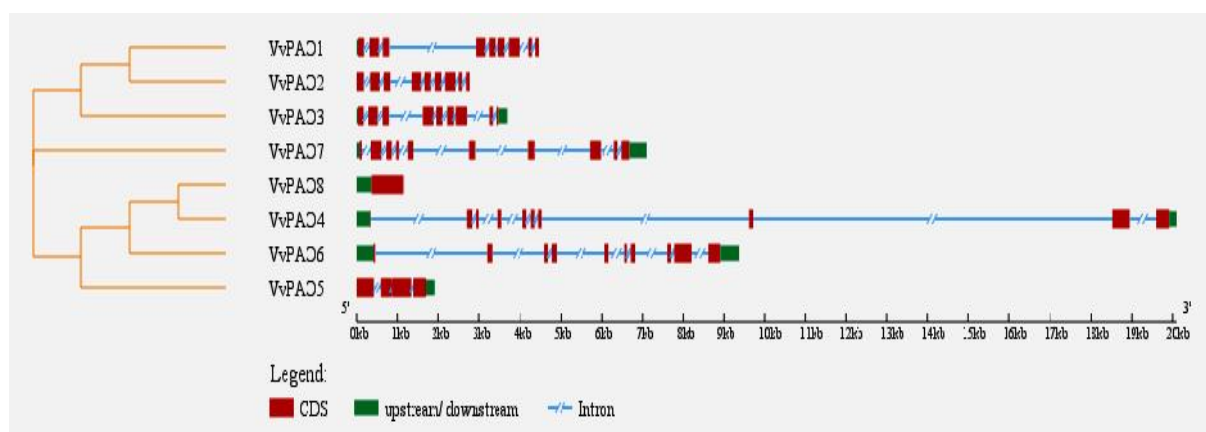
برای درک بهتر روابط تکاملی و فیلوژنتیکی خانواده ژنی PAO انگور، درخت فیلوژنتیکی با روش NJ و بر اساس همردیف سازی چندگانه دمین کارکردی آنزیم‌های PAO برنج، آراییدوپسیس و انگور ایجاد شد. بر اساس امتیاز بوت استرپ (Felsenstein, 1985) و توپولوژی درخت، پروتئین‌ها در سه کلاستر متفاوت قرار گرفتند (شکل ۱). کلاستر یک شامل ژن‌های *VvPAO1*, *VvPAO2*, *VvPAO3* و *VvPAO4* انگور همراه با سه ژن برنج و یک ژن آراییدوپسیس است. کلاستر دو کوچکترین کلاستر درخت فیلوژنتیکی بوده و در آن از هر گیاه یک ژن شامل ژن‌های *OsPAO1*, *VvPAO5* و *AtPAO5* قرار دارند. کلاستر سه ۹ عضو دارد که شامل ژن‌های *VvPAO4*, *VvPAO6* و *VvPAO8* و سه ژن برنج و سه ژن آراییدوپسیس است. با توجه به اینکه انگور و آراییدوپسیس گیاهان دولپه‌ای بوده و نسبت به برنج تک لپه دارای روابط تکاملی نزدیکتری هستند؛ بنابراین در هر سه کلاستر درخت فیلوژنتیکی ژن‌های PAO انگور و آراییدوپسیس در زیر گروه‌های مشترک قرار گرفته‌اند (شکل ۱).

نکته جالب توجه در مورد این درخت فیلوژنتیکی قرار گرفتن ژن‌های با کارکرد یکسان در یک کلاستر است. بر اساس مطالعات، آنزیم‌های PAO برنج و آراییدوپسیس کلاستر یک مرحله آخر کاتابولیسم پلی آمین‌ها در آپوپلاست را کatalیز می‌کنند. ژن‌های برنج و آراییدوپسیس دو کلاستر دیگر که در سیتوپلاسم و پراکس‌زوم فعال هستند در تبدیل معکوس پلی آمین‌ها نقش دارند (Chen et al. 2016; Takahashi et al. 2010; Liu et al. 2014). بنابراین بر اساس سازماندهی دمین *Amino_oxidase* و نیز فعالیت کاتالیتیکی و جایگاه فعالیت درون سلولی، این آنزیم‌ها به سه گروه مطابق درخت فیلوژنتیکی تقسیم می‌شوند. به نظر می‌رسد کارکرد ژن‌های اورتولوگ گونه‌های مختلف در هر کلاستر به احتمال زیاد و نه به طور کامل حفاظت شده باشد در حالی که ژن‌های پارالوگ احتمال دارد در جهت کارکرد زیستی جدید نسبت به ژن جد خود تکامل یابند (Guo et al. 2008). بر این اساس ژن‌های *VvPAO* در هر کلاستر درخت فیلوژنتیکی می‌تواند کارکرد مشابه با ژن‌های PAO برنج و آراییدوپسیس آن گروه

داشته باشد همچنان که در هر گروه جایگاه سلولی ژن‌های *VvPAO*, *OsPAO* و *AtPAO* باهم تطابق دارند (جدول ۲).

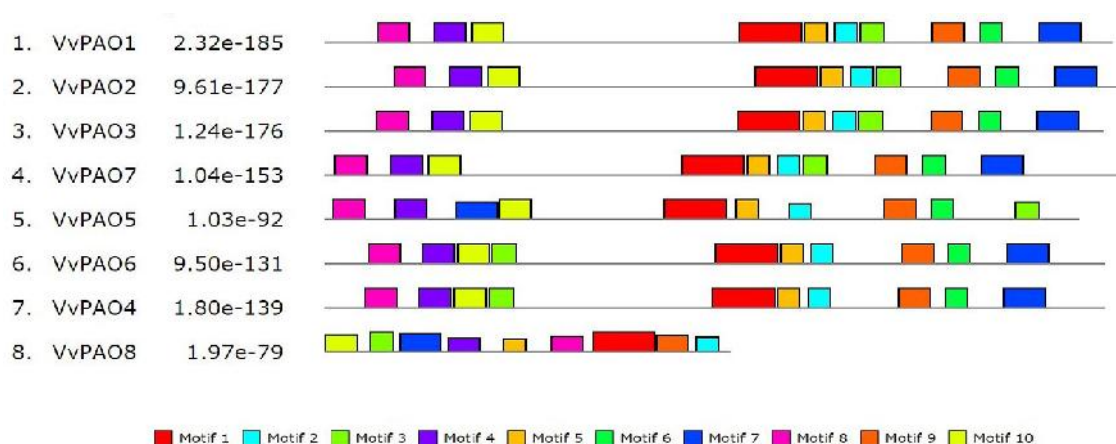
تجزیه و تحلیل ساختار ژنی و شناسایی موتیف‌های حفاظت شده

بررسی ساختار اگزون-اینترونی می‌تواند شواهد بیشتری در تأیید گروه بندی درخت فیلوژنتیکی و روابط تکاملی ارائه نماید زیرا این نوع تنوع ساختاری اغلب نقش مهمی در تکامل خانواده‌های ژنی دارد (Zhang et al. 2012). بررسی ساختار ژنی نشان داد که ژن‌های *VvPAO1*, *VvPAO2* و *VvPAO3* دارای ۸ ایترون هستند. همچنین سه ژن *VvPAO4*, *VvPAO6* و *VvPAO7* ۹ ایترون و ژن *VvPAO5* ۳ ایترون دارند. ژن *VvPAO8* فاقد ایترون است (شکل ۲). در سطح DNA ژن‌های *VvPAO4*, *VvPAO6* و *VvPAO7* به ترتیب با طول تقریبی ۲۰، ۹/۵ و ۷ کیلوباز بیشترین طول را در بین این ژن‌ها دارند. با مقایسه ساختار ژنی و رابطه تکاملی این خانواده ژنی می‌توان دریافت که در کلاستر یک درخت فیلوژنتیکی تفاوت اصلی مشاهده شده وجود یک ایترون بیشتر و همچنین طول بیشتر ایترون‌ها در ژن *VvPAO7* نسبت به ژن‌های *VvPAO1*, *VvPAO2* و *VvPAO3* است. همچنین در کلاستر سه درخت فیلوژنتیکی ژن *VvPAO8* فاقد ایترون بوده که نشان دهنده مسیر تکاملی متفاوت این ژن نسبت به دو ژن *VvPAO4* و *VvPAO6* است (شکل ۲).



شکل ۲- ساختار اگزون-ایترونی ژنهای PAO انگور مطابق رابطه فیلوژنتیکی آنها

Figure 2- The exon-intron structure of grape PAO genes according to the phylogenetic relationship.



شکل ۳- موتیف‌های حفاظت شده پروتئین‌های PAO انگور که با MEME شناسایی شده‌اند. هر موتیف با رنگ متفاوت مشخص بوده و توالی مربوط به آنها در جدول ۳ ارائه شده است.

Figure 3- Schematic representation of putative conserved motifs identified MEME in grape PAO proteins. Ten motifs are indicated by different colored boxes and the regular motif sequences are shown in the table 3.

Amino_oxidase هستند (جدول ۳). اگرچه ۱۰ موتیف شناسایی شده در همه این ژن‌ها وجود دارند با این حال توزیع و جایگاه آنها تا حدودی متفاوت است. بعنوان مثال موتیف ۷ در VvPAO8 و VvPAO5 نزدیک به انتهای آمینوی پروتئین قرار دارند در حالی که در سایر ژن‌ها جایگاه این موتیف انتهای کربوکسیل پروتئین است. همچنین با توجه به کوتاه بودن طول پروتئین VvPAO8 (۲۵۵ اسید آمینه) موتیف‌های موجود در این پروتئین به صورت متراکم کنار هم قرار گرفته‌اند (شکل ۳).

برای شناسایی موتیف‌های حفاظت شده در توالی پروتئینی خانواده VvPAO، توالی پروتئین‌های این خانواده بوسیله نرم‌افزار MEME مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس این بررسی ۱۰ موتیف حفاظت شده در توالی پروتئینی همه این ژن‌ها شناسایی شد (شکل ۳).

ارزیابی موتیف‌ها با Pfam و SMART نشان داد که موتیف ۸ مربوط به جایگاه اتصال کوفاکتور FAD بوده و همچنین سایر موتیف‌های شناسایی شده اختصاصی دمین

جدول ۳- موتیف‌های حفاظت شده پروتئین‌های PAO انگور

Table 3- Conserve motifs detected in grape PAO proteins

کارکرد موتیف	توالی	امتیاز	فراوانی	طول	شماره موتیف
Amino_oxidase	VTEISYSCNGVMVKTEDGCVYRADYVIVSV PIGVLQSNLI	1.70E-74	8	40	1
Amino_oxidase	IYTKIFLKFYPYKFWP	6.80E-30	8	15	2
Amino_oxidase	GNGTEFFLYAHEKRGY	7.20E-25	8	16	3
Amino_oxidase	IGGRIHKDNFAGCSVEMGANW	1.50E-31	8	21	4
Amino_oxidase	FKPPLPPWKIEAIYQ	7.10E-23	8	15	5
Amino_oxidase	LVPRWWTDRFYRGSY	1.20E-20	8	15	6
Amino_oxidase	YFTGEHTSQCYNGYVHGAYLAGIDTAE	3.00E-30	8	27	7
FAD binding domain	PSVIIIGAGMSGISA AKTLHD	1.80E-26	8	21	8
Amino_oxidase	EQQSDECTKNEVMMVLRKMFG	1.40E-16	8	21	9
Amino_oxidase	HGGCWMNPVWPMVNKLKLTTY	3.00E-11	8	21	10

شناسایی عناصرهای تنظیمی پیشبر ژن‌های PAO انگور

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

برای درک سازوکار تنظیم رونویسی ژن‌های *VvPAO* جستجوی عناصر *Cis* واکنش دهنده به تنش‌ها و هورمون‌ها در ناحیه ۱/۵ کیلو باز بالادست این ژن‌ها با استفاده از پایگاه داده PlantCare انجام شد. نتیجه این تجزیه و تحلیل شناسایی ۲۰ نوع مختلف از عناصر تنظیمی *Cis* پاسخ به تنش‌ها و هورمون‌ها در ناحیه پیشبر این خانواده بود که فراوانی این عناصر در ناحیه تنظیمی هر یک از ژن‌ها و نیز فراوانی کلی آن‌ها بسیار متنوع است. عنصر تنظیمی *ABRE* بر روی پیشبر ژن *VvPAO8* با فراوانی ۱۰ جایگاه بیشترین فراوانی یک عنصر تنظیمی بر روی یک پیشبر را در بین ژن‌های *VvPAO* دارد. همچنین بیشترین فراوانی کل عنصر تنظیمی مربوط به *TCA-element* با فراوانی ۱۶ جایگاه بر روی پیشبرهای خانواده ژنی *VvPAO* است. عنصر تنظیمی *TC-rich element* بر روی ۷ ژن *VvPAO* قرار

داشته و بر این اساس عمومی‌ترین عنصر تنظیمی پیشبر ژن‌های *VvPAO* است (جدول ۴). وجود عناصر تنظیمی پاسخ به تنش-های زیستی و غیر زیستی و نیز هورمون‌هایی نظیر اکسین، جبرلین، سالیسیلیک اسید، اتیلن، متیل جازمونات نشان دهنده نقش ژن‌های *VvPAO* در بسیاری از فرآیندهای رشد و نمو و دفاعی انگور است.

بررسی بیان ژن‌های PAO آرابیدوپسیس در شرایط تنش غیر زیستی

مطالعه پروفایل بیان ژن‌های با کارکرد نامشخص می‌تواند راهنمای خوبی برای درک کارکرد آن‌ها باشد (Singh et al. 2015). برای بدست آوردن داده‌های بیانی در مورد نقش ژن‌های *PAO* انگور در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی ریزآرایه عمومی در دسترس در سایت GEO جستجو شد. با وجود داده‌های ریزآرایه انگور برای تنش‌های غیر زیستی نظیر شوری و خشکی، جستجوی پروب‌ست ID اختصاصی برای ژن‌های *VvPAO* در سایت Affymetrix نتیجه‌ای نداشت و تنها برای ژن *PAO6* پروب‌ست ID تعریف شده بود و سه ژن *VvPAO1*، *VvPAO2* و *VvPAO3* پروب‌ست ID مشترک داشتند و نتایج آن قابل تفسیر نبود.

جدول ۴- فراوانی و کارکرد عناصر تنظیمی ناحیه پیشبر ژنهای *PAO* انگور**Table 4-** Frequency and function of regulatory elements in promoter region of grape *PAO* genes

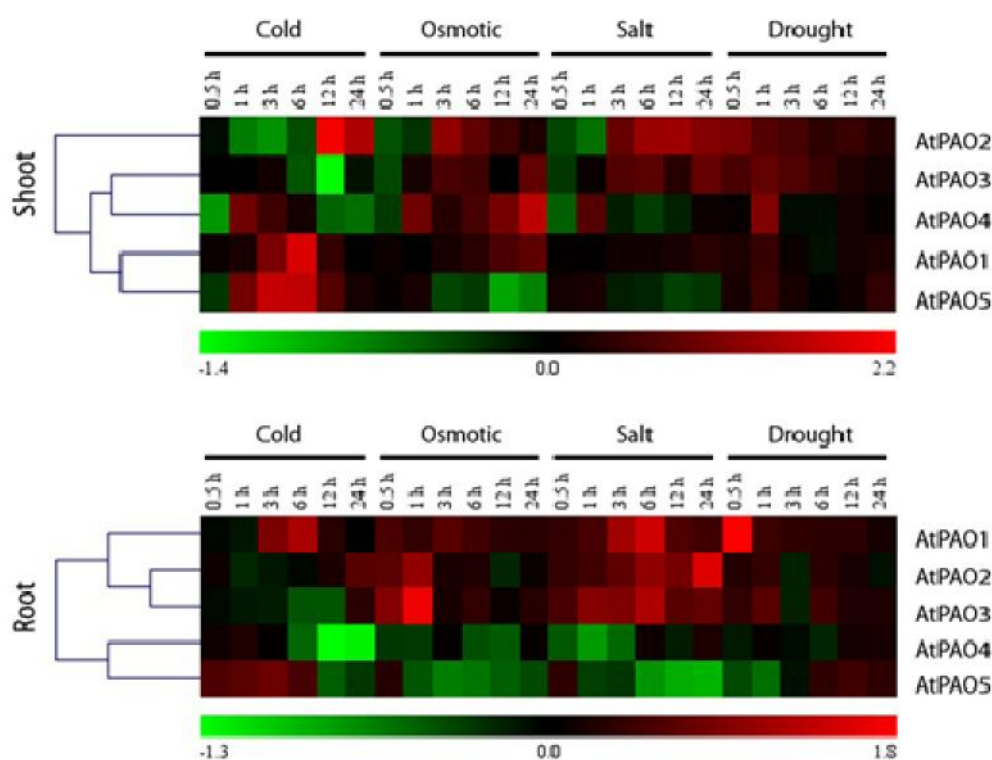
عنصر تنظیمی	کارکرد	ژنهای <i>PAO</i> انگور <i>VvPAO</i>							
		<i>PAO1</i>	<i>PAO2</i>	<i>PAO3</i>	<i>PAO4</i>	<i>PAO5</i>	<i>PAO6</i>	<i>PAO7</i>	<i>PAO8</i>
ABRE	پاسخ به آبسیزیک اسید						1	1	10
ARE	پاسخ به شرایط بی‌هوای		2		3		1		
AuxRR-core	پاسخ به اکسین	1				1			
Box-W1	پاسخ به الیستور قارچی	1							
CGTCA-motif	پاسخ به متیل جازمونات			1	1		1	3	2
EIRE	پاسخ به الیستور					1			
ERE	پاسخ به اتیلن	1	1						
GARE-motif	پاسخ به جبرلین				1				
GCC box	پاسخ به زخم و پاتوژن			1					
HSE	پاسخ به شوک حرارتی	2	1		1		1	2	
LTR	پاسخ به دمای پایین						3	1	
MBS	پاسخ به خشکی		1	3	2	1		1	4
P-box	پاسخ به جبرلین		1						1
TCA-element	پاسخ به سالیسیلیک اسید		4	5	1	1		2	3
TC-rich repeats	پاسخ به تنش‌ها	2	1	1	1	2	1	1	
TGA-box	پاسخ به اکسین						1		
TGACG-motif	پاسخ به متیل جازمونات			1	1		1	3	2
TGA-element	پاسخ به اکسین					1			1
W box	پاسخ به پاتوژن					1			
WUN-motif	پاسخ به زخم		1						

ژن در ریشه می‌شود (شکل ۴- الف و ب). تنش‌های شوری و اسمزی تأثیر مثبت بر بیان ژن *AtPAO2* در ریشه و ساقه داشته و همچنین بیان این ژن در اثر تنش سرما در ساقه افزایش می‌یابد (شکل ۴- الف و ب). بیان ژن *AtPAO3* در اثر تنش شوری در ریشه افزایش یافته و در اثر تنش سرما در ساقه سرکوب می‌شود (شکل ۴- الف و ب). تنش سرما موجب سرکوب بیان ژن *AtPAO4* در ریشه می‌شود در حالی که بیان این ژن در اثر تنش-های خشکی و اسمزی در ساقه افزایش می‌یابد (شکل ۴- الف و ب). ژن *AtPAO5* تنها به تنش سرمایی پاسخ داده و در اثر این تنش بیان آن در ساقه افزایش می‌یابد (شکل ۴- الف و ب). با توجه به نتایج پروفایل بیانی ریزآرایه و نیز رابطه بین ژن‌های *PAO* اورتولوگ بین انگور و آرابیدوپسیس احتمال دارد بیان و کارکرد ژن *VvPAO5* و *VvPAO7* به ترتیب مشابه بیان و کارکرد

در مطالعه‌ای که بر روی خانواده ژنی *NAC* گیاه *pigeon pea* انجام گرفت از داده‌های بیانی ژن‌های *NAC* آرابیدوپسیس جهت شناسایی ژن‌های *NAC* پاسخ به تنش‌ها در *pigeon pea* استفاده شد. برای این منظور از طریق رسم درخت فیلوژنتیکی ژن‌های اورتولوگ *NAC* گیاه *pigeon pea* در آرابیدوپسیس شناسایی و بیان آن‌ها بررسی و در نهایت ۳۶ ژن *NAC* پاسخ به تنش در *pigeon pea* شناسایی شد (Satheesh et al. 2014). همچنین این روش برای بررسی بیان ژن‌های خانواده *DERB* سیب با استفاده از داده‌های ریزآرایه آرابیدوپسیس بکار رفته است (Zhao et al. 2012). بنابراین در این مطالعه بیان ژن‌های همولوگ *VvPAO* در آرابیدوپسیس ارزیابی شد. بر اساس نتایج ریزآرایه بیان ژن *AtPAO1* در اثر تنش‌های سرما و خشکی در ریشه و ساقه افزایش معنی‌دار داشته و تنش شوری موجب القاء بیان این

اورتولوگ بوده و ژن دیگر بعد از انشقاق و در اثر مضاعف شدگی ایجاد و کارکرد ژن *AtPAO4* بین این دو ژن تقسیم شده باشد. مطالعه پاسخ ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم انگور نسبت به تنش خشکی نشان داد که دلیل مقاومت در ژنوتیپ مقاوم *Meski* (MSK) القاء بیان ژن‌های *PAO* و *DAO* (*CuAO*) و افزایش فعالیت آنزیم‌های کد شده توسط این ژن‌ها می‌باشد. همچنین مشخص شد که در شرایط تنش شوری مسیرهای کاتابولیکی مربوط به *PAO* و *DAO* در تنظیم کارآیی فتوسنتزی و نیز پاسخ ایمنی و مقاومت گیاه به پاتوژن *Botrytis cinerea* نقش دارند (Hatmi et al. 2015). بدیهی است مطالعات بیشتر و دقیق‌تر برای تعیین نقش کارکردی ژن‌های *VvPAO* ضروری است.

ژن‌های *AtPAO1* و *AtPAO5* باشد (شکل ۱). وجود دو ژن اورتولوگ برای یک ژن نشان دهنده ایجاد مضاعف شدگی در گونه دارای دو ژن اورتولوگ بعد از انشقاق دو گونه است (Li et al. 2014). این ژن مضاعف شده در طی تکامل یا به ژن کاذب تبدیل می‌شود و یا کارکرد جدیدی پیدا کرده و یا بخش از کارکرد ژن مادری را حفظ می‌کند (Hurles, 2004). ژن *VvPAO6* دو ژن اورتولوگ *AtPAO3* و *AtPAO2* دارد که احتمال دارد از طریق مضاعف شدگی بعد از انشقاق ایجاد شده‌اند (شکل ۱). از نظر تکاملی احتمال دارد ژن *VvPAO6* کارکرد هر دو ژن را داشته باشد. در مورد ارتباط ژن‌های *VvPAO8* و *VvPAO4* با ژن *AtPAO4* نیز می‌توان چنین فرضی را مطرح کرد. بنظر می‌رسد ژن *AtPAO4* قبل از انشقاق آرابیدوپسیس و انگور در ۱۵۰ میلیون سال پیش (Kiritsas et al. 2012) با یکی از این دو ژن انگور



شکل ۴- پروفایل بیانی ژن‌های اورتولوگ *PAO* آرابیدوپسیس بر اساس داده‌های ریزآرایه در شرایط تنش غیرزیستی. نقشه حرارتی میزان چند برابری تغییر بیان ژن‌های *PAO* آرابیدوپسیس در ریشه و ساقه را در شرایط تنش‌های غیرزیستی نشان می‌دهد. ارزش نسبی سیگنال به صورت نوار رنگی در انتهای نقشه حرارتی ارائه شده است که در آن رنگ سبز نشان دهنده سرکوب بیان، رنگ سیاه نشان دهنده عدم تغییر بیان و رنگ قرمز نشان دهنده القاء بیان است.

Figure 4- Microarray-based expression profile of *Arabidopsis* PAO genes under various abiotic stress conditions. Heat maps show the fold changes in expression of *Arabidopsis* PAO genes in root and shoot tissues under different abiotic stress conditions. Relative signal values are represented by color bar shown at the bottom of heat map; thereby green color representing down-regulation, black signifies no change in expression and red shows up-regulation.

نتیجه گیری نهایی

در مطالعه حاضر ۸ ژن *PAO* در انگور با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی شناسایی و ویژگی‌های پروتئینی، روابط تکاملی، ساختار ژن و بیان آن‌ها بررسی شد. بر اساس مطالعه فیلوژنتیکی، ژن‌های *VvPAP* در ۳ کلاستر قرار می‌گیرند که مطابق گروه بندی ژن‌های *PAO* در آرکیدوپسیس و برنج است. در هر کلاستر کارکرد و جایگاه سلولی ژن‌ها یکسان است. همچنین مشخص شد که ساختار ژنی و توزیع موتیف‌های این ژن‌ها در هر کلاستر تا حدود زیادی حفاظت شده هستند. الگوی بیان

ژن‌های اورتولوگ *VvPAO* در آرکیدوپسیس نشان دهنده اهمیت نقش این ژن‌ها در پاسخ گیاه به تنش‌های غیر زیستی است. بررسی بیان ژن‌های *PAO* انگور در مراحل مختلف رشد و نمو و نیز پاسخ به تنش‌ها با روش‌هایی نظیر نوردن بلات و qRT-PCR به منظور بررسی نقش آن‌ها می‌تواند مفید باشد. همچنین نتایج این تحقیق می‌تواند در مطالعات مربوط به بررسی نقش کارکردی بالقوه ژن‌های *PAO* انگور کمک کرده و در طراحی آزمایشات برای تعیین نقش دقیق هر یک از ژن‌های *VvPAO* در نمو و پاسخ به تنش‌ها استفاده شود.

منابع

- Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, De Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A and Gasteiger E. 2012. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. Nucleic acids research 40 (W1): W597-W603.
- Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, Marshall KA, Phillippy KH, Sherman P.M and Holko M. 2013. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. Nucleic acids research 41: D991-D995.
- Cervelli M, Bianchi M, Cona A, Crosatti C, Stanca M, Angelini R, Federico R and Mariottini P. 2006. Barley polyamine oxidase isoforms 1 and 2 a peculiar case of gene duplication. FEBS Journal 273: 3990-4002.
- Chen BX, Li WY, Gao YT, Chen ZJ, Zhang WN, Liu QJ, Chen Z and Liu J. 2016. Involvement of polyamine oxidase-produced hydrogen peroxide during coleorhiza-limited germination of rice seeds. Frontiers in Plant Science 7.
- Danquah A, de Zelicourt A, Colcombet J and Hirt H. 2014. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. Biotechnology advances 32: 40-52.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39 (4): 783-791.
- Fincato P, Moschou PN, Spedaletti V, Tavazza R, Angelini R, Federico R, Roubelakis-Angelakis KA, Tavladoraki P. 2011. Functional diversity inside the Arabidopsis polyamine oxidase gene family. Journal of Experimental Botany 62: 1155-1168.
- Finn RD, Bateman A, Clements J, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J. 2013. Pfam: the protein families database. Nucleic acids research 42: 222- 230.
- Gehan MA, Greenham K, Mockler TC, McClung CR. 2015. Transcriptional networks—crops clocks and abiotic stress. Current opinion in plant biology 24: 39-46.
- Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N. 2012. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. Nucleic acids research 40: D1178-D1186.
- Groppa M, Benavides M. 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. Amino acids 34: 35-45.
- Guo J, Wu J, Ji Q, Wang C, Luo L, Yuan Y, Wang Y, Wang J. 2008. Genome-wide analysis of heat shock transcription factor families in rice and Arabidopsis. Journal of genetics and genomics 35: 105-118.
- Hatmi S, Gruau C, Trotel-Aziz P, Villaume S, Rabenoelina F, Baillieul F, Eullaffroy P, Clément C, Ferchichi A, Aziz A. 2015. Drought stress tolerance in grapevine involves activation of polyamine oxidation contributing to improved immune response and low susceptibility to Botrytis cinerea. Journal of Experimental Botany 66(3): 775-787.
- Hu B, Jin J, Guo AY, Zhang H, Luo J, Gao G. 2014. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. Bioinformatics 31 (8): 1296-1297.

- Hurles M. 2004.** Gene duplication: the genomic trade in spare parts. *PLoS Biology* 2: e206.
- Ibraheem O, Botha CE, Bradley G. 2010.** *In silico* analysis of cis-acting regulatory elements in 5' regulatory regions of sucrose transporter gene families in rice (*Oryza sativa* Japonica) and *Arabidopsis thaliana*. *Computational biology and chemistry* 34: 268-283.
- Ikbali FE, Hernández JA, Barba-Espín G, Koussa T, Aziz A, Faize M, Diaz-Vivancos P. 2014.** Enhanced salt-induced antioxidative responses involve a contribution of polyamine biosynthesis in grapevine plants. *Journal of plant physiology* 171: 779-788.
- Jiang SY, Ma Z, Ramachandran S. 2010.** Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. *BMC evolutionary biology* 10: 1.
- Kritsas K, Wuest SE, Hupalo D, Kern AD, Wicker T, Grossniklaus U. 2012.** Computational analysis and characterization of UCE-like elements (ULEs) in plant genomes. *Genome research* 22: 2455-2466.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016.** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution* 33 (7): 1870-1874.
- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y. 2008.** Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 228: 367-381.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown N, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R. 2007.** Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P, Rombauts S. 2002.** PlantCARE a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research* 30: 325-327.
- Letunic I, Doerks T, Bork P. 2012.** SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic acids research* 40: D302-D305.
- Li Q, Zhao P, Li J, Zhang C, Wang L, Ren Z. 2014.** Genome-wide analysis of the WD-repeat protein family in cucumber and *Arabidopsis*. *Molecular genetics and genomics* 289: 103-124.
- Liu JH, Nada K, Honda C, Kitashiba H, Wen XP, Pang XM, Moriguchi T. 2006.** Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress: importance of the arginine decarboxylase pathway in stress response. *Journal of Experimental Botany* 57: 2589-2599.
- Liu JH, Peng T, Dai W. 2014.** Critical cis-acting elements and interacting transcription factors: key players associated with abiotic stress responses in plants. *Plant molecular biology reporter* 32: 303-317.
- Liu JH, Wang W, Wu H, Gong X, Moriguchi T. 2015.** Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. *Frontiers in plant science* 6.
- Liu T, Wook Kim D, Niitsu M, Berberich T, Kusano T. 2014.** POLYAMINE OXIDASE 1 from rice (*Oryza sativa*) is a functional ortholog of *Arabidopsis* POLYAMINE OXIDASE 5. *Plant signaling and behavior* 9: e29773.
- Ma Y, Dai X, Xu Y, Luo W, Zheng X, Zeng D, Pan Y, Lin X, Liu H, Zhang D. 2015.** COLD1 confers chilling tolerance in rice. *Cell* 160: 1209-1221.
- Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI. 2014.** CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic acids research* 43: D222-D226.
- Moschou P, Wu J, Cona A, Tavladoraki P, Angelini R, Roubelakis-Angelakis K. 2012.** The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. *Journal of experimental botany* 63: 5003-5015.
- Moschou PN, Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA. 2008.** Plant polyamine catabolism: the state of the art. *Plant signaling and behavior* 3: 1061-1066.
- Prakash S, Singh R, Lodhi N. 2014.** Histone demethylases and control of gene expression in plants. *Cellular and molecular biology* 60: 97-105.
- Rangan P, Subramani R, Kumar R, Singh AK, Singh R. 2014.** Recent advances in polyamine metabolism and abiotic stress tolerance. *BioMed research international* 2014.
- Satheesh V, Jagannadham PTK, Chidambaramathan P, Jain P, Srinivasan R. 2014.** NAC transcription factor genes: genome-wide identification phylogenetic motif and cis-regulatory element analysis in pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). *Molecular biology reports* 41: 7763-7773.
- Sengupta A, Chakraborty M, Saha J, Gupta B, Gupta K. 2016.** Polyamines: Osmoprotectants in Plant Abiotic Stress Adaptation. In: Iqbal N, Nazar R, Khan N. A (Eds.) *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies*, Springer, India, 97-127.

- Shibaya T, Hori K, Ogiso-Tanaka E, Yamanouchi U, Shu K, Kitazawa N, Shomura T, Ebana K, Wu J. 2016.** Hd18 encoding histone acetylase related to Arabidopsis FLOWERING LOCUS D is involved in the control of flowering time in rice. *Plant and Cell Physiology* 57 (9): 1828-1838.
- Singh AK, Kumar R, Tripathi AK, Gupta BK, Pareek A, Singla-Pareek S.L. 2015.** Genome-wide investigation and expression analysis of Sodium/Calcium exchanger gene family in rice and Arabidopsis. *Rice* 8: 1.
- Singh AK, Sharma V, Pal AK, Acharya V, Ahuja P.S. 2013.** Genome-wide organization and expression profiling of the NAC transcription factor family in potato (*Solanum tuberosum* L.). *DNA research* 20: 403-423.
- Takahashi Y, Cong R, Sagor G, Niitsu M, Berberich T, Kusano T. 2010.** Characterization of five polyamine oxidase isoforms in Arabidopsis thaliana. *Plant cell reports* 29: 955-965.
- Tavladoraki P, Rossi MN, Sacchi G, Perez-Amador MA, Polticelli F, Angelini R, Federico R. 2006.** Heterologous expression and biochemical characterization of a polyamine oxidase from Arabidopsis involved in polyamine back conversion. *Plant Physiology* 141: 1519-1532.
- Tripathi AK, Singh K, Pareek A, Singla-Pareek S.L. 2015.** Histone chaperones in Arabidopsis and rice: genome-wide identification, phylogeny, architecture and transcriptional regulation. *BMS Plant biology* 15: 42.
- Wang W, Liu JH. 2015.** Genome-wide identification and expression analysis of the polyamine oxidase gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Gene* 555: 421-429.
- Wei KF, Chen J, Chen YF, Wu LJ, Xie DX. 2012.** Molecular phylogenetic and expression analysis of the complete WRKY transcription factor family in maize. *DNA research* 19 (2): 153-164.
- Zhang Y, Gao M, Singer S.D, Fei Z, Wang H, Wang X. 2012.** Genome-wide identification and analysis of the TIFY gene family in grape. *PLoS One* 7: e44465.
- Zhao T, Liang D, Wang P, Liu J, Ma F. 2012.** Genome-wide analysis and expression profiling of the DREB transcription factor gene family in Malus under abiotic stress. *Molecular genetics and genomics* 287: 423-436.
- Zhou S, Ma S, Li M, Li C, Gong X, Guan Q, Tan Y, Shao Y, Chao Li C, Ma, F. 2016.** Comprehensive genomic analysis and expression profiling of Argonaute gene family and examination of their regulatory roles in water-use efficiency and abiotic stress responses in apple. *Acta Physiologiae Plantarum* 38: 231.

In silico study of polyamine oxidase (PAO) gene family in grape

Amin Abedi, Mohammad Mehdi Sohani*, Reza Shirzadian-Khoramabad

Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture Science, University of Guilan, Rasht, Iran

*Corresponding Author: msohani@guilan.ac.ir

Abstract

Growth, development and productivity of plants are greatly affected by various abiotic stresses. Physiological and molecular studies have shown that naturally occurring plant polyamines (PAs) are involved in conferring abiotic stress tolerance in plants. Polyamine oxidases (PAOs) are FAD-dependent enzymes associated with polyamine catabolism in peroxisomes, the apoplast and the cytoplasm. In plants, increasing evidence supports the idea that *PAO* genes play essential roles in abiotic and biotic stresses responses. In this study, bioinformatic analysis identified eight putative *PAO* genes (*VvPAO1–VvPAO8*) in grape (*Vitis vinifera*) using the released 12×assembled grape genomic sequences. Phylogenetic analysis indicates that these *VvPAOs* can be classified into three subgroups as found in *Arabidopsis* and rice and also reveal that grape *PAO* proteins are more closely related to *Arabidopsis* than to those in rice. The *VvPAO* genes contained zero to nine introns and were distributed across 6 out of the 19 chromosomes in grape. Promoter analysis showed the presence of several cis-regulatory elements related to stress and hormone responses in regulatory regions, indicating their probable role in stress response. Microarray-based expression analysis of *VvPAO* orthologs in *Arabidopsis* under abiotic stresses showed that transcript levels of *PAO* genes were up-regulated significantly by such treatments, indicating their vital roles during stress adaptation. The results obtained provide basic information for future research on the functions of *PAO* genes in grape.

Key Words: Abiotic Stress, Bioinformatics, Gene Expression, Phylogenetic Analysis, Polyamine