

خصوصیات تکاملی ژنوم و تجزیه و تحلیل بیان دیجیتال ژن‌های مرتبط

با مسیر بیوسنتز پلی آمین‌ها در نخود زراعی

Genome-wide evolutionary characterization and digital expression analysis related to polyamine biosynthetic genes in chickpea

سعید امینی^۱، رضا معالی‌امیری^{۲*}، هلن پورمظاهری^۳

۱- دانش‌آموخته دکتری دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی کرج دانشگاه تهران و استادیار بخش شناسایی و ثبت ارقام گیاهی، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- استاد، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی کرج دانشگاه تهران

۳- دانش‌آموخته پسا دکتری دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی کرج دانشگاه تهران و گروه بیولوژی، دانشکده علوم، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

Amini S¹, Maali-Amiri R^{*2}, Poormazaheri H³

- 1- Graduated PhD Student from College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, and Faculty member of Seed and Plant Certification and Registration Research Institute (SPCRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
- 2- Professor, Faculty member of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj
- 3- Graduated Postdoc Student from College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran and Department of Biology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rmamiri@alumni.ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۱۵

چکیده

در گیاهان پوترسین (Put)، اسپرمیدین (Spd) و اسپرمین (Spm)، همه به خانواده پلی آمین‌ها تعلق دارند و نقش آن‌ها در چندین فرآیند زیستی از جمله رشد، نمو و پاسخ به محرک‌های محیطی به میزان اندکی مطالعه شده است. این پژوهش به توصیف تکاملی *in-silico* ژنوم اعضای خانواده ژن‌های مسیر بیوسنتز پلی آمین‌ها شامل آرژنین/ارنیتین دکرُبوسیلاز (ADC/ODC)، Spd سینتاز (SPDS) و Spm سینتاز (SPMS) و الگوی بیان دیجیتال این ژن‌ها در مراحل نمو در بافت‌های مختلف نخود (*Cicer arietinum* L.)، همراه با تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژنی (GO) و شبکه ژنی مبتنی بر ارتباط ژن-ژن می‌پردازد. ژن‌های بیوسنتزی پلی آمین‌ها، همگی بر روی کروموزوم‌های ۲، ۴، ۵ و ۶ مستقر بودند. چارچوب خوانش باز (ORF) آن‌ها ۹۹۰ تا ۲۱۹۹ جفت‌باز بوده و پروتئین‌هایی را رمزگذاری می‌کردند که محتوی ۳۲۹ تا ۷۳۲ اسیدآمینه بود. مقادیر وزن مولکولی برای این توالی‌ها از ۳۶/۵۹ تا ۷۸/۷۴ کیلو دالتون (kDa) بود. پیش‌بینی مکان‌بایی درون سلولی نشان داد که پروتئین‌های ADC، SPDSs و SPMS احتمالاً در آپوپلاست (خارج سلول) قرار دارند در حالی که ODC عمدتاً در میتوکندری مستقر می‌باشد. پیش‌بینی شکل سه‌بعدی (3-D) این پروتئین‌ها بیانگر تنوع ساختاری آن‌هاست. تجزیه و تحلیل ساختار دوم نشان داد که این پروتئین‌ها درصدهای متفاوتی از آلفا هلیکس، بتا شیت، مارپیچ و حالت دور برگردان دارند. تجزیه و تحلیل ساختار ژن نشان داد که توالی ژن‌های ADC و ODC منحصربه‌فرد بوده در حالی که برای SPDSs و SPMS دابل شدن تکراری و پراکنده رخ داده است. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک دیدگاه عمیق‌تری در مورد روابط تکاملی مابین پروتئین‌ها و همچنین کارکردهای احتمالی آن‌ها ارائه می‌دهد. همدردی چندگانه شباهت زیادی را در دومن‌های حفاظت شده نشان دادند اما در دو انتهای آمینی و کربوکسیلی واگرایی داشتند. درخت فیلوژنتیک نشان داد که در نخود توالی ADC و ODC موتیف‌های پروتئینی بسیار حفاظت شده‌ای داشته و هیچ ایترونی در توالی این دو ژن وجود نداشت. نتایج بیانگر آن است که SPDSها و SPMSها حاوی هفت تا ده ایترون هستند و اکثر این ایزوformها دارای تعداد اگزون مشابه اما طول اگزون و ایترون متفاوت هستند. تجزیه و تحلیل بیان دیجیتال ژن در طول فرآیندهای رشد نشان داد که ژن‌های مسیر بیوسنتز پلی آمین‌ها نقش به‌سزایی در تنظیم دقیق چرخه زندگی گیاهان دارند. با توجه به نتایج داده کاوی در پایگاه اطلاعاتی EST، سطوح بیان بالای این ژن‌ها خصوصاً ADC در ریشه و برگ نخود زراعی شناسایی شد، در حالی که ODC در چنین شرایطی دارای سطوح بیان کم یا بدون بیان بود. این اطلاعات منبعی مفید در تحقیقات آینده در مورد عملکرد و ساختار اعضای خانواده ژن‌های مرتبط با بیوسنتز پلی آمین گیاهی محسوب شده و به کارگیری و دستکاری مسیرهای متابولیک ژنی مرتبط با پلی آمین‌ها را در برنامه‌های اصلاحی نخود فراهم می‌آورد.

واژه‌های کلیدی

بیوسنتز پلی آمین‌ها
ساختار و شبکه ژنی
مشخصه‌یابی ژنومیک
نخود

مقدمه

پلی آمین ها (PAs) آمین های آلی کوچکی هستند که در سلول های پروکاریوت و یوکاریوت یافت می شوند (Kusano et al. 2008). در گیاهان، PAs نقش کلیدی در رشد و نمو و همچنین پاسخ به تنش های زیستی و غیرزیستی دارند (Ebeed et al. 2017; Metabolism et al. 2018). فراوان ترین PAs در گیاهان پوتریسین (Put)، اسپرمیدین (Spd) و اسپرمین (Spm) هستند، در حالی که کاداورین، ترموسپرمین، نورسپرمیدین و نورسپرمین فراوانی کمتری دارند (Metabolism et al. 2018). محتوی و عملکرد PAs عمدتاً با تغییرات سنتز و تجزیه آنها تنظیم می شود. بیوسنتز Put از طریق آنزیم آرژنین دکربوکسیلاز (ADC) از آرژنین و یا آنزیم ارنیتین دکربوکسیلاز (ODC) از ارنیتین انجام می شود، در حالی که تبدیل Put به Spd به نیاز Spd به سینتاز (SPDS) داشته و بیوسنتز Spm توسط اسپرمین سینتاز (SPMS) انجام می شود (Hussain et al. 2011). گروه های آمینوپروپیل استفاده شده برای سنتز Spd و Spm توسط S-adenosylmethionine (SAMDC) در طی تبدیل S-adenosylmethionine (SAM) به Sadenosylmethionine (SAM) پیش ماده سنتز اتیلن محسوب شده که نوعی هموستازی مابین PAs و بیوسنتز اتیلن ایجاد می کند (Hussain et al. 2011; Kusano et al. 2008). تجزیه Put توسط دی آمین اکسیدازها (CuAOs) انجام می شود، در حالی که کاتابولیسم نهایی تری آمین Spd و تترامین Spm توسط پلی آمین اکسیدازها (PAOs) تنظیم می شود (Kusano et al. 2008; Kim et al. 2014; Liu et al. 2014a, 2014b; Planas-Portell et al. 2013). پژوهش ها نقش کلیدی PAs در طی فرایندهای نمو گیاهان گلدار را گزارش کرده اند (Alabadí et al. 1995). تحقیقات اولیه در نخود زراعی نشان داده که میزان Spm در تخمدان های خودگرد افشان کاهش می یابد، اما در آغاز پیری در تخمدان های گرده افشانی نشده افزایش می یابد (Gomez-Jimenez et al. 2010). PAs در طی فرایند میوه دهی در سیب (Biasi et al. 1988)، انگور (Shiozaki et al. 2000)، انبه (Malik and Singh 2004)، پرتقال (Tassoni et al. 2004)، هلو (Liu et al. 2006; Ziosi et al. 2006) و گوجه فرنگی (Rastogi and Davies 1991)

فعالیت می کنند. به طور کلی، محتوی بالاتر PAs در مراحل اولیه رشد میوه همراه با کاهش تدریجی در طی مراحل رسیدن میوه مشاهده شده است (Kushad et al. 1988). به عنوان نمونه، در انگور محتوی Put و Spd در طی فرایند رسیدن شدیداً کاهش می یابد، در حالی که محتوی Spm در طی فرایند رسیدن تقریباً ثابت می ماند (Shiozaki et al. 2000). در گوجه فرنگی سطوح Put به تدریج در طی مراحل بلوغ میوه افزایش می یابد و در مرحله رسیدن قرمز به بالاترین میزان می رسد، در حالی که محتوی Spd و Spm در این مرحله کمترین میزان را دارد (Tsaniklidis et al. 2016). در آووکادو، محتوی PAs در شروع رشد میوه بسیار افزایش می یابد و سپس تا مرحله رسیدن کاهش می یابد (Kushad et al. 1988). بنابراین، محتوی و کارکرد PAs مختلف وابسته به مرحله رشد و نمو گیاه متفاوت است. در طی رشد تخمدان توتون، فعالیت آنزیم ODC به طور قابل توجهی در بین مراحل گرده افشانی و لقاح افزایش یافت، در حالی که محتوی PAs تا زمان لقاح ثابت ماند و سپس به طور معنی داری افزایش یافت (Slocum and Galston 1985). به نظر می رسد، این تفاوت ها به میزان زیادی با آنزیم های مؤثر در سوخت و ساز و سنتز PAs در ارتباط است.

در این مطالعه، از تحلیل گسترده ژنومی *in-silico* به منظور بررسی شبکه ای ساختار و بیان ژن های مرتبط با مسیر بیوسنتز PAs بافت های مختلف استفاده شد. با انجام این پژوهش، پنج ایزوفرم ژنی کاندید مؤثر در سنتز PAs شناسایی شدند. تجزیه و تحلیل شبکه ای ساختارهای ژنی و پروتئینی، روابط فیلوژنتیکی، الگوی بیان دیجیتال اختصاصی اندام های مختلف و همچنین نحوه وقوع پدیده تکثیر، دیدگاه های عمیق تری در زمینه فرایندهای نمو گیاه فراهم می کند. این تجزیه و تحلیل ها برای نمایش سازوکارهای کارکردی اساسی PAs در نخود انجام گرفته است. این یافته ها مبنای مناسبی برای توصیف کارکرد ژن های مسیر بیوسنتز PAs در نخود و سایر گیاهان فراهم می کنند.

مواد و روش ها

توالی ژن ها و پروتئین های مؤثر در مسیر بیوسنتز PAs در نخود (*Cicer arietinum* L.)، آراییدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)

برش $1.0E^{-5}$ E-value، انجام شد (Ghannam et al. 2016; Amini et al. 2017). پایگاه‌های اطلاعاتی و فایل‌های استفاده شده در این مطالعه، مواردی بودند که در تاریخ ۱۵ جون ۲۰۲۲ در دسترس بودند. بر طبق شاخص‌های پیش‌فرض قوانین مستندسازی، این نرم‌افزار عبارات GO را به توالی‌های پرس‌وجو اختصاص می‌دهد. به‌منظور تهیه مستندسازی GO برای توصیف اجزای سلولی، عملکرد مولکولی و فرآیند زیستی توالی‌ها از نرم‌افزار BLAST2GO استفاده شد. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی با استفاده از داده‌های مستندسازی GO توسط تارنمای (Du et al. 2010) AgriGO که از جستجوی همسانی پروتئین‌های آرآبیدوپسیس استفاده می‌کند، انجام شد.

هستی‌شناسی ژن‌های مسیر بیوستز PAS در پاسخ به تنش سرما در عبارات GO Slim توسط جستجوی InterProScan (IPS) به‌عنوان ورودی خلاصه شد و توسط نرم‌افزار Cytoscape نسخه ۳.۴ در یک شبکه کارکردی سازماندهی شد (Ghannam et al. 2016). این ابزار نقشه شبکه زیستی را برای عبارات GO و تخصیص ژن ترسیم کرد. خوشه‌بندی ژن‌ها به‌روش تک‌پیوندی انجام شد. گره‌ها و پیوندهای برجسته شده، ارتباط ژن‌ها و ژن فعال را نمایش می‌دهند. قدرت پیوند بین این عبارات کاربردی بررسی شده توسط رنگ گره‌ها و عرض خطوط ارتباطی تعیین شد.

توالی ترانسکریپتوم غلاف جوان (SRX3165241)، گل (SRX3165240)، ریشه (SRX3165239)، برگ (SRX3165238) نخود دسی (ICC 4958) و توالی ترانسکریپتوم برگ نخود وحشی (PI489777)، (SRX3165242) از بخش SRA پایگاه اطلاعاتی NCBI بارگیری شد. خوانش‌هایی که بر روی تا ۲۰ توالی ژنی هم‌ردیف شده بودند به‌عنوان یک توالی مورد توافق شمارش شدند. سپس توالی‌های هم‌ردیف شده به دو گروه Sense و Antisense تقسیم شدند و تعداد خوانش‌های هم‌ردیف شده برای هر مدل ژنی نخود از هر نمونه توسط اسکریپت in-house در زبان برنامه‌نویسی perl استخراج شدند. این اسکریپت همچنین خوانش‌هایی را که تا حدودی^۲ بر روی UTR^۳ها قرار می‌گیرند،

(L. و برنج (*Oryza sativa* L.) (به‌ترتیب به‌عنوان گیاهان مدل دولپه و تک‌لپه) از پایگاه اطلاعاتی NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) بازیابی شد. خصوصیات پروتئینی این ژن‌ها توسط وزن مولکولی (MW) و نقطه ایزوالکتریک (pI) برای هر توالی توسط پایگاه اطلاعاتی ExPASy (<https://www.expasy.org/>) تعیین شد. جایگاه سلولی این پروتئین‌ها توسط Cell-PLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc/>)، (Chou and Shen 2010) تعیین شد. توالی این ژن‌ها توسط نرم‌افزار MCSanX برای بررسی وقایع تکثیر ژنی تجزیه و تحلیل شد (Wang et al. 2012). پیش‌بینی مدل سه بعدی پروتئین‌های مسیر بیوستز PAS توسط پایگاه اطلاعاتی Swiss-Pdb Viewer v4.1.0 (Guex et al. 2009) انجام شد. ارزیابی ساختاری توسط آنالیز پلات Rampage Ramachandran (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) انجام شد (Lovell et al. 2003).

بررسی روابط تکاملی بین اعضا یک خانواده ژنی نیازمند هم‌ردیف سازی صحیح و رسم درخت فیلوژنتیکی با الگوریتم مناسب است. به‌منظور مقایسه روابط فیلوژنتیک ژن‌های مسیر بیوستز PAS در نخود و سایر گونه‌های گیاهی از جمله آرآبیدوپسیس و برنج هم‌ردیف‌سازی پروتئین‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalX 2.0.8 (Larkin et al. 2007) و رسم درخت فیلوژنتیکی با نرم‌افزار MEGA7 (Kumar et al. 2016) بر اساس روش joining neighbor (N.J.) و آزمون بوت استرپ (Felsenstein 1985) با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد.

الگوی توزیع ایترونها از طریق مقایسه توالی CDS نسبت به DNA ژنومی مربوط به هر ژن با استفاده از پایگاه اطلاعاتی GSDD انجام گرفت (Hu et al. 2015) برای شناسایی موتیف‌های پروتئینی اختصاصی از پایگاه اطلاعاتی MEME استفاده شد (Bailey et al. 2006). پارامترهای مورد استفاده شامل تعداد موتیف‌ها هشت عدد و کمترین و بیشترین طول موتیف‌ها به‌ترتیب ۶ و ۵۰ اسیدآمینو بود.

در این مطالعه، تجزیه و تحلیل BLAST توالی‌های رمزکننده مسیر بیوستز PAS توسط نرم‌افزار BLAST2GO نسخه ۷.۲.۳ با

¹ Query sequence

² Partial

³ Untranslated region

وزن مولکولی (MW) برای این توالی‌ها از ۳۶/۵۹ تا ۷۸/۷۴ کیلودالتون (kDa) تغییر کرده در حالی که نقطه ایزوالکتریکی (pI) ۵/۰۸ تا ۶/۶۷ بود (جدول ۲). پیش‌بینی مکان‌یابی درون سلولی نشان داد که پروتئین‌های ADC، SPDSs و SPMS احتمالاً در آپوپلاست (خارج سلول) مستقر بوده در حالی که ODC عمدتاً در میتوکندری قرار داشت (جدول ۲). همچنین پیش‌بینی شکل سه‌بعدی (3-D) ساختار دوم و گراف رامچاندرا^۶ این پروتئین‌ها بیانگر تنوع ساختاری این پروتئین‌هاست (شکل ۱ و ۲). تجزیه و تحلیل ساختار دوم نشان داد که پروتئین‌های ADC، SPDS1، SPDS2 و SPMS به ترتیب دارای ۴۴/۶، ۳۵/۷، ۳۲/۷ و ۳۱/۷ درصد Alpha-helices و ۲۴، ۲۸/۹ و ۲۷/۲، ۲۵/۳ و ۳۰/۴ درصد Beta sheet و ۲/۴، ۲/۲، ۶/۱ و ۵/۱ درصد Turn هستند (شکل ۱). بر اساس گراف رامچاندرا^۶ (شکل ۲) که بر اساس زوایای Phi و Psi که نحوه تاخوردن پروتئین‌ها در ساختار دوم پروتئین و ایجاد موتیف‌ها را نمایش می‌دهد، زاویه Phi پروتئین‌های ADC، SPDS1، SPDS2 و SPMS به ترتیب ۷۹/۲۱، ۴۴/۹۲، ۱۰۳/۳۵، ۱۱۰/۹۳ و ۱۱۰/۹۲ درصد گزارش شده در حالی که زاویه Psi پروتئین‌های ADC، SPDS1، SPDS2 و SPMS به ترتیب ۲۵/۲۳، ۱۴۲/۹۱، ۱۱۵/۶۷، ۶۴/۰۶ و ۶۴/۰۸ درصد محاسبه شد.

^۴ Molecular weight

^۵ Isoelectric Point

^۶ Ramachandran

شمارش می‌کند. خوانش‌های نقشه‌برداری شده RPKM توسط اسکریپت in-house بر اساس طول آگزون 2.3 ITAG و همچنین تعداد کل خوانش‌هایی که بر روی ژنوم نخود قرار می‌گرفتند، محاسبه شد. برای تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های انتخاب شده در بافت‌های مختلف، میانگین مقادیر RPKM برای هر نوع بافت نمایش داده می‌شود.

نتایج و بحث

شناسایی ژن‌ها و پروتئین‌های مؤثر در مسیر بیوسنتزی PAs

ژن‌های مسیر بیوسنتزی PAs در ژنوم نخود، آرکیدوپسیس و برنج در پایگاه داده NCBI شناسایی و بازیابی شدند. تمام توالی‌های کاندید از طریق دومن‌های پروتئینی تأیید شدند، که منجر به شناسایی پنج توالی مورد توافق شد، که یک توالی آرژنین دکربوکسیلاز (CaADC)، یک توالی ارنیتین دکربوکسیلاز (CaODC)، دو توالی اسپرمیدین سنتاز (CaSPDS) و یک توالی اسپرمین سنتاز (CaSPMS) را رمزگذاری می‌کند (جدول ۱). چارچوب خوانش باز (ORF)^۳ آن‌ها در اندازه‌های ۹۹۰ تا ۲۱۹۹ جفت‌باز طول داشته (جدول ۱) و پروتئین‌هایی را رمزگذاری می‌کردند که محتوی ۳۲۹ تا ۷۳۲ اسید آمینه بود (جدول ۱). مقادیر

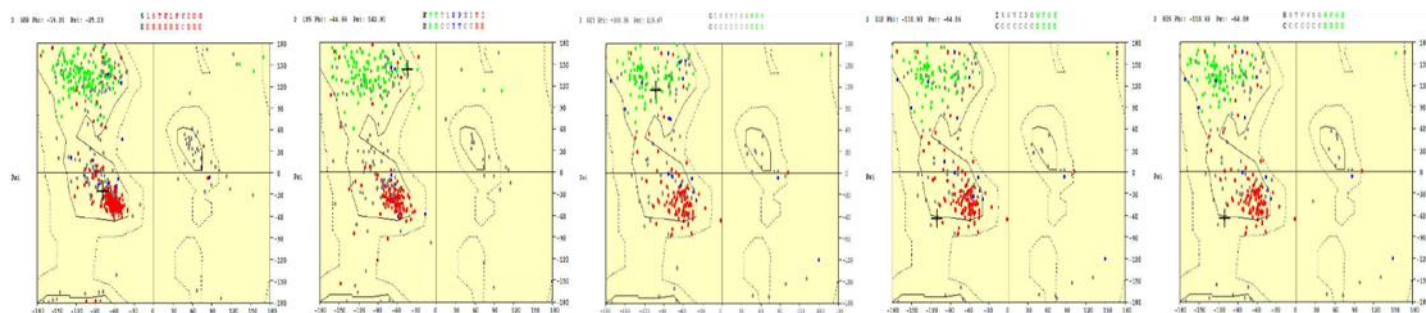
^۱ Reads per kilobase of exon model per million

^۲ Mapped

^۳ Open reading frame



شکل ۱- گراف سه بعدی (3-D) به ترتیب از چپ به راست ساختار دوم پروتئین‌های ADC، SPDS1، SPDS2 و SPMS (ساختارهای الفا-هلیکس و بتا-شیت به ترتیب با رنگ‌های صورتی و زرد در ساختار سه بعدی نمایش داده شده‌اند). ADC، آرژنین دکربوکسیلاز؛ ODC، ارنیتین دکربوکسیلاز؛ SPDS، اسپرمیدین سنتاز؛ SPMS، اسپرمین سنتاز.



شکل ۲- گراف رامچاندرا به ترتیب از چپ به راست ساختار دوم پروتئین‌های ADC، SPDS1، SPDS2، SPMS و (میزان زوایای Φ و Ψ که در تاخوردن هر پروتئین مؤثر است برای هر پروتئین آورده شده است). ADC، آرژنین دکربوکسیلاز؛ ODC، ارنیتین دکربوکسیلاز؛ SPDS، اسپرمیدین سینتاز؛ SPMS، اسپرمین سینتاز.

جدول ۱- خصوصیات توالی‌های ژنی مؤثر در مسیر بیوسنتز PAS در نخود. ADC آرژنین دکربوکسیلاز؛ ODC، ارنیتین دکربوکسیلاز؛ SPDS، اسپرمیدین سینتاز؛ SPMS، اسپرمین سینتاز.

نام ژن	شماره دسترسی	کارکرد	جایگاه ژنی	جایگاه کروموزومی	ناحیه	طول قطعه	نوع دابل	کروموزوم با
					شروع	پایان	شدن	رخداد دابل شدن
ADC	XM_004507452.2	Put synthase	LOC101497888	Chr6	58877658	58880624	2199	Singleton
ODC	XM_004500845.2		LOC101494284	Chr5	31564815	31566328	1284	Singleton
SPDS1	XM_004489799.2	Spd/Spm	LOC101504748	Chr2	8614751	8618770	1023	Dispersed
SPDS2	XM_004509779.2	Synthase	LOC101493259	Chr7	21455474	21460356	990	Dispersed
SPMS	XM_004498382.2		LOC101492874	Chr4	39085788	39089899	1053	Dispersed

جدول ۲- خصوصیات توالی‌های پروتئینی مؤثر در مسیر بیوسنتز PAS در نخود. ADC آرژنین دکربوکسیلاز؛ ODC، ارنیتین دکربوکسیلاز؛ SPDS، اسپرمیدین سینتاز؛ SPMS، اسپرمین سینتاز.

نام پروتئین	شماره دسترسی	کارکرد	طول پروتئین	وزن مولکولی	نقطه ایزالکتریک	شاخص	وضعیت	جایگاه سلولی
			(آمینو اسید)	(دالتون)		ناپایداری	پایداری	
ADC	XP_004507509.1	Put synthase	732	78745.45	5.01	39.63	Stable	Extracellular (Apoplast)
ODC	XP_004500902.1		427	46511.42	6.67	38.49	Stable	Mitochondrial
SPDS1	XP_004489856.1	Spd/Spm synthase	340	37211.33	5.08	47.96	Unstable	Extracellular (Apoplast)
SPDS2	XP_004509836.1		329	36595.75	5.09	45.91	Unstable	Extracellular (Apoplast)
SPMS	XP_004498439.2		350	38939.78	5.2	42.12	Unstable	Extracellular (Apoplast)

اساسی سنتز ژن‌های جدید، حالات مختلف تغییرات ساختار ژنوم و گسترش خانواده‌های ژنی هستند که منجر به پیچیدگی ژنوم در سلسله گیاهان می‌شوند (Wang et al. 2012; Cao et al. 2016). حضور ژن‌های مورد مطالعه بر روی کروموزوم‌های مختلف احتمالاً به رویدادهای تکراری پراکنده و پیچیدگی سازماندهی ژنوم در نخود اشاره دارد (Cannon et al. 2004; Cao et al. 2016). پژوهش‌ها گزارش کرده‌اند که ژن‌های SPDSs و SPMSs عمدتاً از طریق دوپلیکیشن‌های کروموزومی سگمتال^۴، پروگزیمال^۵ و پراکنده گسترش می‌یابند، در حالی که ژن‌های

مکان‌یابی ژن‌ها بر روی کروموزوم و پدیده تکثیر ژن^۱ در

ژن‌های مسیر بیوسنتز PAS

پنج توالی کاندید بر روی پنج کروموزوم مختلف از جمله کروموزوم‌های شماره دو، چهار، پنج، شش و هفت (هر کدام دارای یک توالی)، توزیع شدند. توالی ژن‌های ADC و ODC منحصر بفرد بوده در حالی که برای SPDSs و SPMS دابل شدن پراکنده^۳ رخ داده است (جدول ۱). در طی تکامل، تکثیر ژن (دوپلیکیشن ژنی) همراه با فرایندهای وارونگی و جابه‌جایی سازوکارهای

^۱ Gene duplication

^۲ Singleton

^۳ Dispersed duplication

^۴ Segmental

^۵ Proximal

با رویدادهای دوپلیکیشن ژنی همراه باشد. SPDSها و SPMSها بر اساس حضور موتیف‌های پروتئینی مشابه به دو گروه مشخص تقسیم شدند. آن‌هایی که در گروه I (بالا) بودند در مسیر بیوستنر Spd موثرند، در حالی که گروه II (پایین) در مسیر بیوستنر Spd فعالیت می‌کنند (شکل ۵). نتایج بیانگر آن است که این ژن‌ها حاوی هفت تا ده اینترون در توالی‌های خود هستند (شکل ۵). همچنین بررسی ساختارهای اگزون/اینترون نشان داد که اکثر این ایزوفرم‌ها دارای تعداد اگزون مشابه اما طول اگزون و اینترون متفاوت هستند. نتایج پیشین بیانگر آن است که AtSPMS به‌عنوان AtSPDS3 نیز شناخته می‌شود، بنابراین SPDSها و SPMSها قابل تمایز از یکدیگر نیستند (Vuosku et al. 2018). بنابراین، ژن‌های PAS نخود شباهت زیادی با این ژن‌ها در آرکیدوپسیس و برنج داشتند و یک دومین پروتئین عملکردی حفاظت‌شده و ساختار موتیف پروتئینی تقریباً یکسانی داشتند (شکل‌های ۳، ۴ و ۵). این همچنین تایید کرد که ژن‌های PAS در گیاهان به شدت حفاظت می‌شوند و توالی‌های مشابه را می‌توان در ژن‌های PAS به‌ویژه در CaSPMS و CaSPDSs شناسایی کرد. بر اساس تجزیه و تحلیل MEME، زیرواحد اسیدآمینه حفاظت‌شده در این ژن‌ها تعیین شد. نمایش گرافیکی^۱ توالی موتیف‌های حفظ‌شده در این ژن‌ها نمایش داده شده‌اند (شکل‌های ۳، ۴ و ۵). به‌عنوان استثنا، موتیف شماره هشت در نواحی C ترمینال OsADC2 و AtSPDS1 وجود نداشت در حالی که در CaSPMS موتیف شماره شش وجود نداشت. نتایج نشان داد که جفت ژن‌های تکراری SPDS ساختارهای اگزون/اینترون مشابهی دارند و همسانی توالی اسیدآمینه‌ای بالایی دارند (شکل ۵). اگرچه بر اساس تجزیه و تحلیل دیجیتالی بیان ژن که در ادامه بحث خواهد شد، سطوح بیان مختلفی را بین جفت ژن SPDS دابل شده مشاهده شد، اما همچنان کارکرد آن‌ها در نخود حفاظت‌شده است. بر اساس این نتایج، به‌نظر می‌رسد که پاسخ‌های رونویسی ژن‌های پارالوگ SPDSs ممکن است در طی مراحل رشد و نمو تغییر کنند، در حالی که تنوع عملکردها ممکن است به دوره‌های طولانی و شبکه‌های نظارتی پیچیده وابسته باشد.

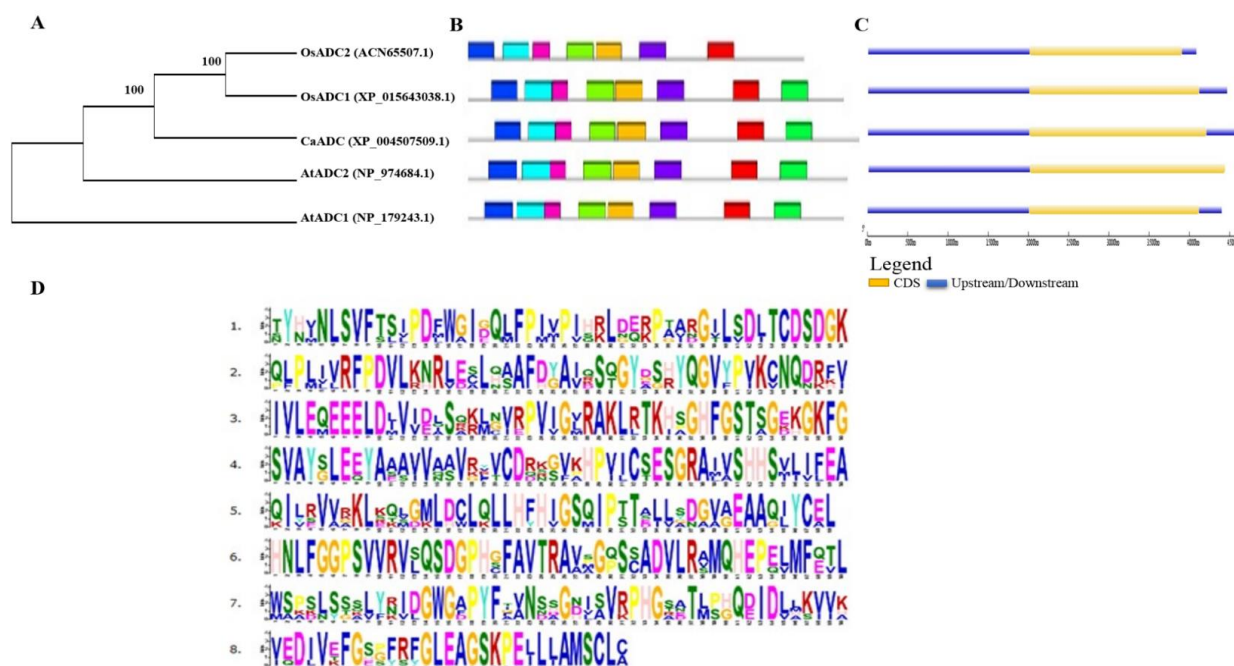
ADCs و ODCs به‌ترتیب دارای دوپلیکیشن‌های سگمنتال و پراکنده هستند (Gong et al. 2018). رویدادهای دوپلیکیشن در بسیاری از خانواده‌های ژنی گزارش شده‌اند، از جمله ژن‌های فاکتور G-box 14-3-3 و پروتئین فسفاتاز نوع ۲C در ژنوم *Brachypodium distachyon* و خانواده ژنی TIFY/JAZ در گوجه‌فرنگی گزارش شده‌اند (Cao et al. 2016; Yang et al. 2017; Chini et al. 2017). وجود پنج ژن در مسیر بیوستنر PAS در نخود به‌همراه تعداد متفاوت ژن‌های مسیر بیوستنر PAS در آرکیدوپسیس (۶ ژن)، برنج (۱۵ ژن)، توتون (۱۴ ژن)، گوجه‌فرنگی (۱۴ ژن)، پرتقال (۱۱ ژن) و سیب (۱۸ ژن) (Liu et al. 2018) بیانگر آن است که رویدادهای تکثیر تکراری ژن در طی تکامل در ژنوم نخود نیز روی داده است.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک، ساختار ژن و دومین پروتئینی

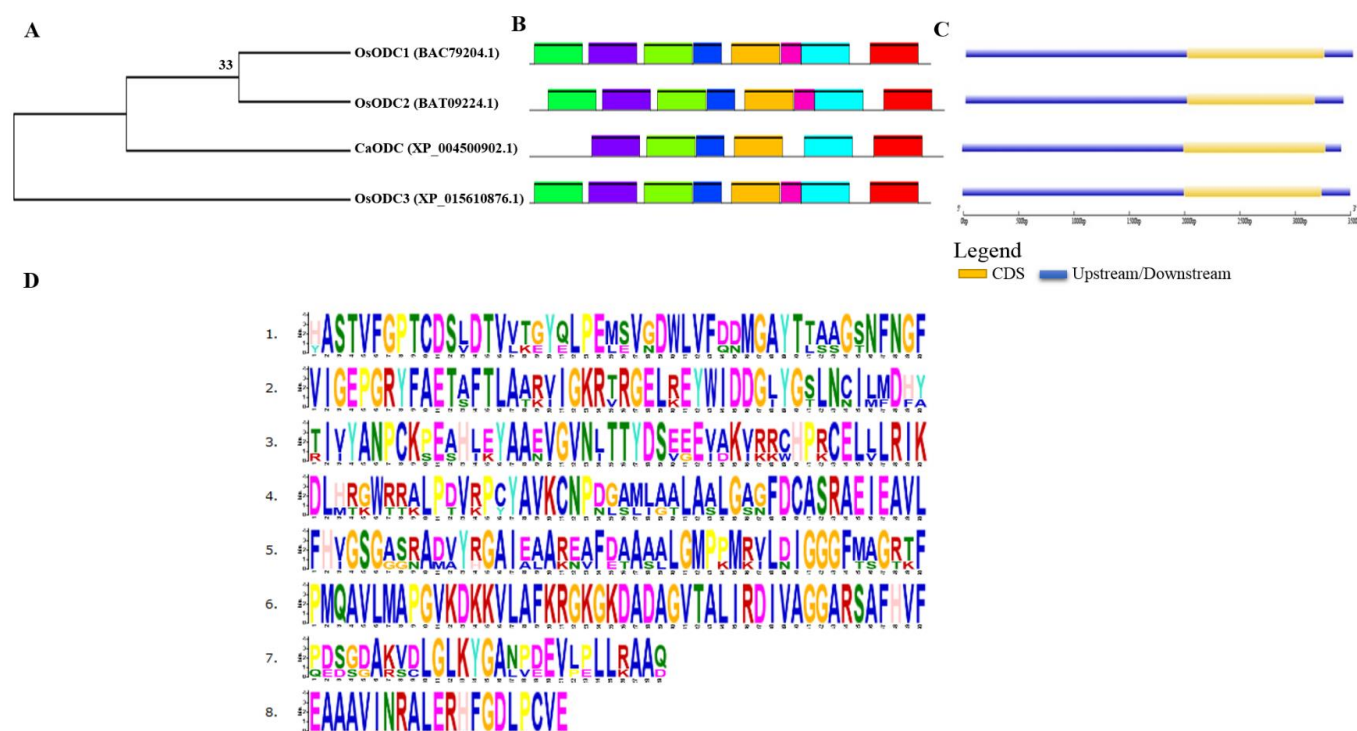
ژن‌های رمزکننده مسیر بیوستنری PAS

به‌دلیل نقش مهم ساختار اگزون/اینترون و دومین‌های پروتئینی در تکامل ژن‌های PAS، تنوع الگوی این ساختارها بر اساس روابط فیلوژنتیکی آن‌ها در نخود، آرکیدوپسیس و برنج بررسی شد. همردیفی چندگانه شباهت زیادی را در دومین‌های حفاظت‌شده نشان دادند اما در انتهای N و C واگرایی داشتند. در میان این گونه‌ها، ADCs، ۶۲/۶ درصد شباهت را در توالی پروتئینی نشان دادند، در حالی که درصد تشابه ODCs، ۷۶/۲ و SPDSs/SPMS، ۷۴/۴ درصد بود. درخت فیلوژنتیک نشان داد که CaADC در نخود و چهار ADC در این سه گونه دارای موتیف‌های پروتئینی بسیار حفاظت‌شده در توالی‌شان بوده و هیچ یک از ژن‌های ADC اینترون نداشتند (شکل ۳). ODCها در نخود و برنج به سه گروه با ساختار موتیف پروتئینی بسیار حفاظت‌شده گروه‌بندی شدند و هیچ یک از این ژن‌ها اینترون نداشتند (شکل ۴). اگرچه پروتئین‌های ADC و ODC در گیاهان برای بیوستنر Put یکسان عمل می‌کنند، آرکیدوپسیس عمدتاً به فعالیت ADC متکی است و ژن ODC تا به‌حال در ژنوم آن شناسایی نشده است (Hanfrey et al. 2001). پژوهش‌ها نشان داده که ژن‌های فاقد اینترون به‌سرعت از طریق رویدادهای دوپلیکیشن ژن تکامل می‌یابند (Lecharn et al. 2003; Lurin et al. 2004; Jain et al. 2006; Cao et al. 2016). بنابراین، توسعه ژن‌های مسیر بیوستنری PAS ممکن است

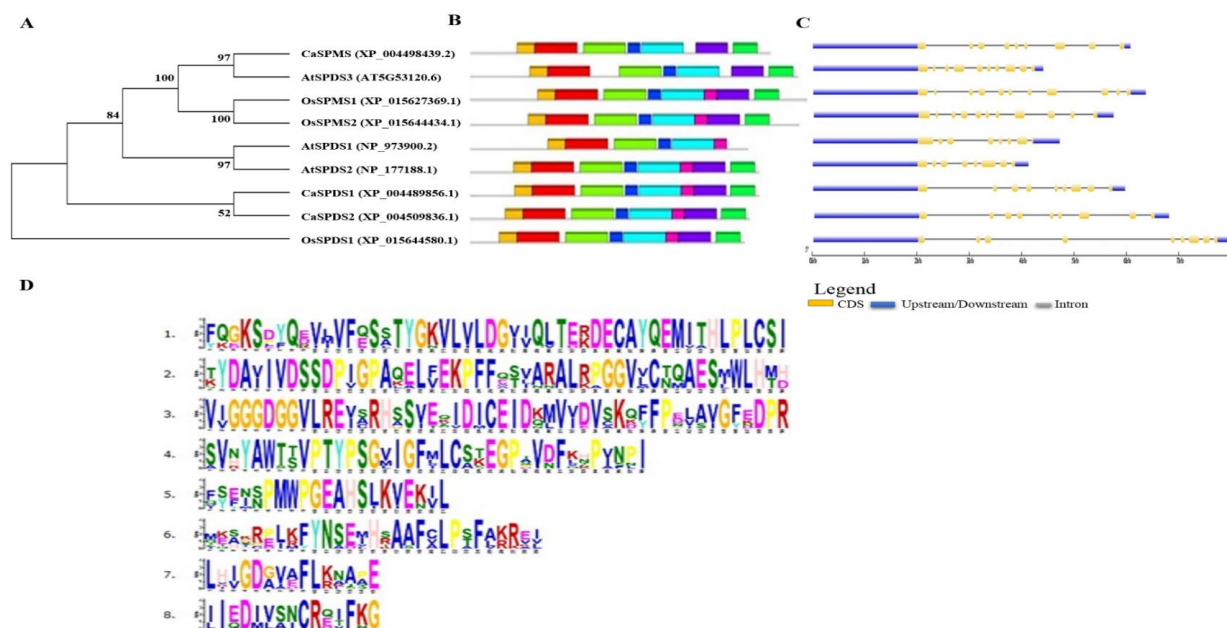
¹ Logo



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی (A)، توالی پروتئینی (B)، توالی ژنی (C)، نمایش گرافیکی پروتئینی توالی رمز کننده ژن آرژنین دکربوکسیلاز (ADC) در نخود، آرابیدوپسیس و برنج.



شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی (A)، توالی پروتئینی (B)، توالی ژنی (C)، نمایش گرافیکی پروتئینی توالی رمز کننده ژن آرژنین دکربوکسیلاز (ODC) در نخود، آرابیدوپسیس و برنج.



شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی (A)، توالی پروتئینی (B)، توالی ژنی (C)، نمایش گرافیکی پروتئینی توالی رمز کننده ژن‌های اسپرمیدین سینتاز و اسپرمین سینتاز (SPDS and SPMS) در نخود، آرابیدوپسیس و برنج.

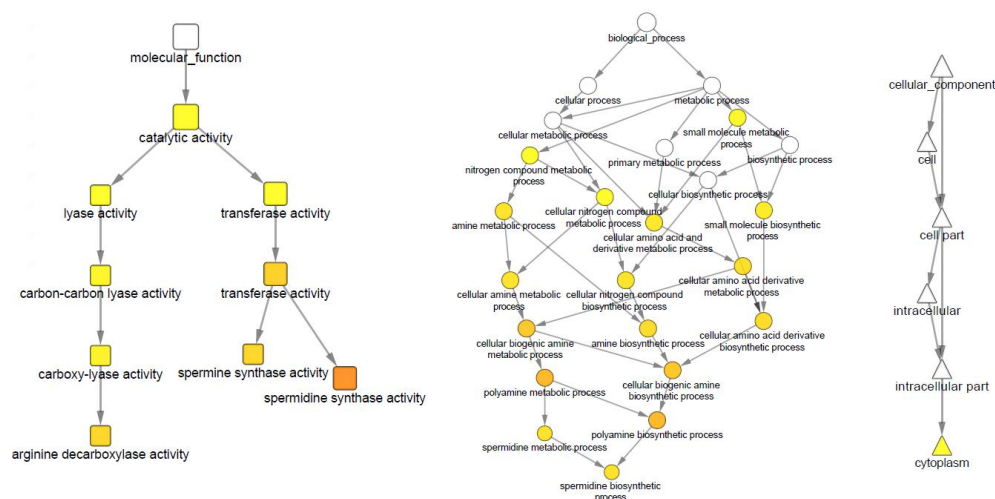
جدول ۳- گروه‌بندی کارکردی توالی‌های مسیر بیوسنتز PAS براساس فرایند زیستی، کارکرد مولکولی و اجزای سلولی تهیه شده توسط نرم‌افزار .BLAST2GO. ADC. آرژنین دکربوکسیلاز؛ ODC. ارنیتین دکربوکسیلاز؛ SPDS اسپرمیدین سینتاز؛ SPMS اسپرمین سینتاز.

نام پروتئین	شماره دسترسی	شماره دسترسی	فرایند زیستی	کارکرد مولکولی	اجزای سلولی
	NCBI	TAIR			
ADC	XP_004507509.1	AT2G16500	Arginine catabolic process; Polyamine biosynthetic process; Putrescine biosynthetic process; Response to cold; Response to oxidative stress; Response to salt stress; Spermidine biosynthetic process	Arginine decarboxylase activity; Protein homodimerization activity	Chloroplast; Cytosol
ODC	XP_004500902.1		Polyamine biosynthetic process	Catalytic activity	Chloroplast; Cytosol
SPDS1	XP_004489856.1	AT1G23820	Polyamine biosynthetic process	Spermidine synthase activity	Chloroplast; Cytosol
SPDS2	XP_004509836.1	AT1G23820	Polyamine biosynthetic process	Spermidine synthase activity	Chloroplast; Cytosol
SPMS	XP_004498439.2	AT5G53120	Polyamine biosynthetic process	Spermidine synthase activity	Chloroplast; Cytosol

تجزیه و تحلیل شبکه ژنی

پاسخ‌های گیاهان در مراحل مختلف رشد و نمو نتیجه ارتباطات عملکردی مابین ژن‌های مؤثر در هر یک از مسیرهای متابولیک است (Liu et al. 2018). بنابراین، شبکه‌سازی مجموعه ژن‌ها ممکن است تنظیم متمایز رونویسی در شرایط مکانی و زمانی خاص در نخود را به‌طور بالقوه نمایش دهد (Ghannam et al. 2016) مجموعه ژنی انتخاب شده در مسیر بیوسنتز PAS، حاوی عناصری است که بر اساس مستندسازی کارکردی، در تنظیم فرایند رشد و نمو مشارکت می‌کند (شکل ۶). مطابق با این شکل

نحوه ارتباطات از طریق پیوندهای معنادار و برجستگی گره‌ها تعیین می‌شوند. شبکه هم‌تنظیم شده پاسخ‌های ژنومی، ترانسکریپتومی، پروتئومی و متابولومیک احتمالاً به‌عنوان بازیگر کلیدی بالقوه در ایجاد هموستازی در پاسخ‌های رشد و نمو در بافت‌های مختلف در نخود مطرح می‌شوند. بنابراین، روابط ژن-ژن در فرآیندهای اندام‌زایی و رشد و نمو نخود با تنظیم‌های متفاوت سطوح فعالیت سلولی و خصوصیات فیزیولوژیکی مرتبط بوده و همچنین با روابط ژنتیکی ارتباط دارد.



شکل ۶- نقشه شبکه عبارات هستی‌شناسی ساخته شده توسط نرم‌افزار Cytoscape v3.3.0. شبکه‌ها شامل پنج ژن هستند که بیان معنی‌داری نشان دادند. قدرت ارتباط میان این عبارات مستندسازی شده توسط رنگ‌گرها و عرض خطوط ارتباطی تعیین می‌شود.

فعالیت‌های متنوع سلولی از جمله در رشد، نمو، بقا و پاسخ به تنش می‌باشد. همچنین ژن‌های رمزکننده مسیر بیوستنز PAS در بافت‌های مختلف گیاهان تحت تنش‌های غیرزیستی، از جمله شوری، سرما، خشکی، قلیایی و همچنین ABA نیز بیان متفاوتی داشتند (Gong et al. 2018; Liu et al. 2018) که نشانگر نقش این مسیر متابولیک در بهبود تحمل به تنش است. بنابراین تجزیه و تحلیل دیجیتال بیان ژن‌های مسیر بیوستنز PAS در بافت‌های مختلف نخود با استفاده از داده‌های ترانسکریپتومی پیشنهاد می‌کند که ژن‌های رمزکننده مسیر بیوستنز PAS به دلیل الگوهای بیان مکانی و زمانی متفاوت در رشد، نمو و بقای گیاه نقش حیاتی دارند.

نتیجه‌گیری کلی

پلی‌آمین‌ها در فرآیندهای زیستی مختلف از جمله رشد، نمو و پاسخ به تنش‌های محیطی نقش دارند. ژن‌های مرتبط با بیوستنز پلی‌آمین‌ها بر روی کروموزوم‌های ۲، ۴، ۵، ۶ و ۷ مستقر بودند. از دیدگاه ژنتیکی، مطالعه این اجزا، به نقش این ژن‌ها در تنظیم فرایندهای رشد و نمو در نخود زراعی اشاره دارد.

چنین شبکه‌هایی دیدگاه‌های آموزنده‌ای درباره نحوه تعامل ژن‌های مسیر بیوستنز PAS با سایر سازوکارهای مولکولی برای حل مسایل کشاورزی از جمله تنظیم فرایندهای رشد و نمو و همچنین پاسخ به تنش ارائه می‌کنند.

تجزیه و تحلیل بیان دیجیتال ژن‌های مسیر بیوستنزی PA

پایگاه داده EST منبع ارزشمندی برای پروژه‌های بیان ژن است (Filiz and Koc 2016). تجزیه و تحلیل بیان دیجیتال ژن‌های مسیر بیوستنزی PAS با استفاده از پایگاه داده EST-NCBI در بافت‌های مختلف (ریشه، برگ، گل، غلاف جوان) نخود دسی ژنوتیپ ICC4958 و همچنین بافت برگ نخود وحشی (*Cicer L.* *reticulatum*) ارزیابی شد (جدول ۴).

با توجه به نتایج داده‌کاوی در پایگاه اطلاعاتی EST، سطوح بیان بالای این ژن‌ها به‌خصوص *ADC* در ریشه و برگ نخود زراعی رخ داده در حالی که *ODC* در چنین شرایطی دارای سطوح بیان کم یا بدون بیان بود (جدول ۴). (Liu et al. 2018) نشان دادند که ژن‌های این مسیر بیوستنزی در بافت‌های مختلف گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum L.*) به میزان متفاوتی بیان می‌شوند به‌طوری‌که به‌جز *SISPDS2* و *SISPDS4* میزان بیان در بافت رویشی از اندام‌های میوه بالاتر است. *CaODC* در برگ و غلاف جوان بیان نشد، درحالی‌که به میزان بسیار کمی در بافت گل بیان شد. در مجموع داده‌ها نشان داد که ژن‌های مسیر بیوستنز PAS در بیش از یک بافت بیان شده که بیانگر مشارکت این ژن‌ها در

جدول ۴- تجزیه و تحلیل بیان دیجیتالی ژنهای مسیر بیوسنتز PAS در نخود بر حسب RPKM، ADC، آرژنین دکربوکسیلاز؛ ODC، ارنیتین دکربوکسیلاز؛ SPDS، اسپرمیدین سینتاز؛ SPMS، اسپرمین سینتاز.

برگ نخود وحشی	ریشه	غلاف جوان	گل	برگ	بافت
ژن					
ADC	223.41	137.67	99.38	209.42	56.55
ODC	13.25	0	0.18	0	3.54
SPDS1	69.25	87.76	101.14	64.90	61.62
SPDS2	16.27	21.33	34.50	30	16.93
SPMS	15.39	39.42	46.89	26.93	18.2

چارچوب خوانش باز این ژن ها ۹۹۰ تا ۲۱۹۹ جفت باز طول داشته و پروتئین هایی را رمزگذاری می کردند که ۳۲۹ تا ۷۳۲ اسید آمینه داشت. مقادیر وزن مولکولی برای این توالی ها از ۳۶/۵۹ تا ۷۸/۷۴ کیلو دالتون (kDa) متغیر بود. پیش بینی مکان یابی درون سلولی نشان داد که پروتئین های ADC، SPDSs و SPMS احتمالاً در آپوپلاست (خارج سلول) مستقر بوده در حالی که ODC عمدتاً در میتوکندری فعالیت داشت. همچنین پیش بینی شکل سه بعدی (3-D) ساختار دوم و گراف رامچاندرا^۱ این پروتئین ها بیانگر تنوع ساختاری این پروتئین هاست. تجزیه و تحلیل ساختار ژن نشان داد که توالی ژن های ADC و ODC منحصر به فرد بوده در حالی که برای SPMS و SPDSs دابل شدن پراکنده رخ داده است. همردیفی چندگانه شباهت زیادی را در دومن های حفاظت شده نشان دادند اما در دو انتهای آمینی و کربوکسیلی واگرایی داشتند. درخت فیلوژنتیک نشان داد که در نخود توالی ADC و ODC موتیف های پروتئینی بسیار حفاظت شده ای دارد و هیچ ایترونی در توالی این دو ژن وجود ندارد. SPDS ها و SPMS ها بر اساس حضور موتیف های پروتئینی مشابه به دو گروه مشخص تقسیم شدند. نتایج بیانگر آن است که SPDS ها و SPMS ها حاوی هفت تا ده ایترون بوده و اکثر این ایزوفرم ها دارای تعداد

اگزون مشابه اما طول اگزون و ایترون متفاوت بودند. تجزیه و تحلیل مستند سازی، ژن ها را در سه گروه اصلی، از جمله عملکرد مولکولی، فرآیند بیولوژیکی و اجزا سلولی طبقه بندی کرد. تجزیه و تحلیل مبتنی بر شبکه بیانگر آن است که بررسی رابطه ژن-ژن و همچنین دسته بندی ژن ها در سطوح کارکردی به بهبود درک مفهوم فیزیولوژیک ژن های مسیر بیوسنتز PAS در نخود منجر خواهد شد. با توجه به نتایج داده کاوی در پایگاه اطلاعاتی EST، سطوح بیان بالای این ژن ها خصوصاً ADC در ریشه و برگ ژنوتیپ نخود زراعی شناسایی شده در حالی که ODC در چنین شرایطی دارای سطوح بیان کم یا بدون بیان بود. به نظر می رسد که تغییرات نسبی سریع و گذرا سطح بیان دیجیتالی ژن های مسیر بیوسنتز PAS در بافت های مختلف احتمالاً برای تنظیم دقیق مراحل رشد و نمو اهمیت دارد و می تواند به عنوان نشانگر کارکردی تنظیم چنین فرآیندهایی در نخود مطرح شود. نتایج ما می تواند نقطه آغازی برای بررسی ارتباط ژن ها یا پروتئین های مسیر بیوسنتز PAS در سطوح مولکولی باشد. به دلیل آنکه بهره وری اغلب محصولات با تنظیم شرایط رشد و نمو در شرایط مزرعه در ارتباط است، چنین یافته هایی احتمالاً کاربرد جدیدی برای اسپری پاشی پلی آمین ها به منظور بهبود رشد، نمو و تحمل به تنش های محیطی در نخود ایجاد می کند.

^۱ Ramachandran

منابع

Alabadí D, Aguero MS, Pérez-Amador, MA, Carbonell J (1996) Arginase, arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase, and polyamines in tomato ovaries (changes in unpollinated ovaries and parthenocarpic fruits induced by auxin or gibberellin). Plant Physiology 112:1237-1244. Attrill H, Gaudet P, Huntley RP, Lovering RC, Engel SR, Poux S, Wood V (2019) Annotation of gene product

function from high-throughput studies using the Gene Ontology. Database 2019. Biasi R, Bagni N, Costa G (1988). Endogenous polyamines in apple and their relationship to fruit set and fruit growth. Physiologia Plantarum 73:201-205. Cannon S B, Mitra A, Baumgarten A, Young ND, May G (2004) The roles of segmental and tandem gene

- duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 4:10.
- Cao J, Jiang M, Li P, Chu Z (2016) Genome-wide identification and evolutionary analyses of the PP2C gene family with their expression profiling in response to multiple stresses in *Brachypodium distachyon*. *BMC genomics* 17:175.
- Chini A, Ben-Romdhane W, Hassairi A, Aboul-Soud MA (2017) Identification of TIFY/JAZ family genes in *Solanum lycopersicum* and their regulation in response to abiotic stresses. *PloS ONE* 12:e0177381.
- Chou, KC, Shen HB (2008) Cell-PLoc: a package of Web servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms. *Nature Protocols*. 3:153-162.
- Chou KC, Shen HB, (2010) Plant-mPLoc: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization. *PLoS One* 5:e11335.
- Du Z, Zhou X, Ling Y, Zhang Z, Su Z (2010) AgriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Research* 38:W64eW70.
- Ebeed HT, Hassan NM, Aljarani AM (2017) Exogenous applications of polyamines modulate drought responses in wheat through osmolytes accumulation, increasing free polyamine levels and regulation of polyamine biosynthetic genes. *Plant Physiology and Biochemistry* 118:438-448.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Filiz E, Koc I (2016) Genome-wide identification and comparative analysis of EPSPS (aroA) genes in different plant species. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 25:21-29.
- Fortes AM, Agudelo-Romero P (2018) Polyamine metabolism in climacteric and non-climacteric fruit ripening. *Polyamines* 433-447.
- Ghannam A, Alek H, Doumani S, Mansour D, Arabi MI (2016) Deciphering the transcriptional regulation and spatiotemporal distribution of immunity response in barley to *Pyrenophora graminea* fungal invasion. *BMC genomics* 17:256.
- Gomez-Jimenez MC, Paredes M A, Gallardo M, Fernandez-Garcia N, Olmos E, Sanchez-Calle IM (2010) Tissue-specific expression of olive S-adenosyl methionine decarboxylase and spermidine synthase genes and polyamine metabolism during flower opening and early fruit development. *Planta* 232:629-647.
- Gong X, Dou F, Cheng X, Zhou J, Zou Y, Ma F (2018) Genome-wide identification of genes involved in polyamine biosynthesis and the role of exogenous polyamines in *Malus hupehensis* Rehd. under alkaline stress. *Gene*, 669, 52-62.
- Hanfrey C, Sommer S, Mayer MJ, Burtin D, Michael AJ (2001) *Arabidopsis* polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *The Plant Journal* 27:551-560.
- Hu B, Jin J, Guo AY, Zhang H, Luo J, Gao G (2014) GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics* 31:1296-1297.
- Hussain SS, Ali M, Ahmad M, Siddique KH (2011) Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology Advances* 29:300-311.
- Jain M, Tyagi, AK, Khurana JP (2006) Genome-wide analysis, evolutionary expansion, and expression of early auxin-responsive SAUR gene family in rice (*Oryza sativa*). *Genomics* 88:360-371.
- Kim DW, Watanabe K, Murayama C, Izawa S, Niitsu M, Michael AJ, Kusano T (2014) Polyamine oxidase5 regulates *Arabidopsis* growth through thermospermine oxidase activity. *Plant Physiology* 165:1575-1590.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 228:367-381.
- Kushad MM, Yelenosky G, Knight R (1988) Interrelationship of polyamine and ethylene biosynthesis during avocado fruit development and ripening. *Plant Physiology* 87:463-467.
- 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.
- Lecharny A, Boudet N, Gy I, Aubourg S, Kreis M (2003) Introns in, introns out in plant gene families: a genomic approach of the dynamics of gene structure. *Journal of Structural and Functional Genomics* 3:111-116.
- Liu, J., Nada K, Pang X, Honda C, Kitashiba H, Moriguchi T (2006) Role of polyamines in peach fruit development and storage. *Tree Physiology* 26:791-798.
- Liu T, Huang B, Chen L, Xian Z, Song S, Chen R, Hao Y (2018) Genome-wide identification, phylogenetic analysis, and expression profiling of polyamine synthesis gene family members in tomato. *Gene* 661:1-10.
- Liu T, Kim DW, Niitsu M, Berberich T, Kusano T (2014) *Oryza sativa* polyamine oxidase 1 back-converts tetraamines, spermine and thermospermine, to spermidine. *Plant Cell Reports* 33:143-151.
- Liu T, Kim D W, Niitsu M, Maeda S, Watanabe, M, Kamio Y, Kusano T (2014) Polyamine oxidase 7 is a terminal catabolism-type enzyme in *Oryza sativa* and is specifically expressed in anthers. *Plant Cell Physiology* 55:1110-1122.
- Lurin C, Andrés C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyère C, Lecharny A (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *The Plant Cell* 16:2089-2103.
- Malik AU, Singh Z (2004) Endogenous free polyamines of mangos in relation to development and ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 129:280-286.
- Planas-Portell J, Gallart M, Tiburcio AF, Altabella T (2013) Copper-containing amine oxidases contribute to terminal polyamine oxidation in peroxisomes and apoplast of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 13:1-13.
- Rastogi R, Davies PJ (1991) Polyamine metabolism in ripening tomato fruit: II. Polyamine metabolism and

- synthesis in relation to enhanced putrescine content and storage life of a/c tomato fruit. *Plant Physiology* 95:41-45.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Shiozaki S, Ogata T, Horiuchi S (2000) Endogenous polyamines in the pericarp and seed of the grape berry during development and ripening. *Scientia Horticulturae* 83:33-41.
- Slocum RD, Galston AW (1985) Changes in polyamine biosynthesis associated with postfertilization growth and development in tobacco ovary tissues. *Plant Physiology* 79:336-343.
- Tassoni A, Germana MA, Bagni N (2004) Free and conjugated polyamine content in *Citrus sinensis* Osbeck, cultivar Brasiliano NL 92, a Navel orange, at different maturation stages. *Food chemistry* 87:537-541.
- Thompson JD, Gibson T, Higgins DG (2002) Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current Protocols in Bioinformatics* <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0203s00>
- Tsaniklidis G, Kotsiras A, Tsafouros A, Roussos PA, Aivalakis G, Katinakis P, Delis C (2016) Spatial and temporal distribution of genes involved in polyamine metabolism during tomato fruit development. *Plant Physiology and Biochemistry* 100:27-36.
- Verma V, Raju SC, Kapley A, Kalia VC, Dagainawala HF, Purohit HJ (2010) Evaluation of genetic and functional diversity of *Stenotrophomonas* isolates from diverse effluent treatment plants. *Bioresource Technology* 101:7744-7753.
- Vuosku J, Karppinen K, Muilu-Mäkelä R, Kusano T, Sagor GHM, Avia K, Sarjala, T (2018) Scots pine aminopropyltransferases shed new light on evolution of the polyamine biosynthesis pathway in seed plants. *Annals of Botany* 121:1243-1256.
- Wang Y, Tang H, DeBarry JD, Tan X, Li J, Wang X, Kissinger JC (2012) MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic Acids Research* 40:e49-e49.
- Yang L, You J, Wang Y, Li J, Quan W, Yin M, Chan Z (2017) Systematic analysis of the G-box Factor 14-3-3 gene family and functional characterization of GF14a in *Brachypodium distachyon*. *Plant Physiology and Biochemistry* 117:1-11.
- Ziosi V, Bregoli A M, Bonghi, C, Fossati T, Biondi S, Costa G, Torrigiani P (2006) Transcription of ethylene perception and biosynthesis genes is altered by putrescine, spermidine and amino ethoxy vinyl glycine (AVG) during ripening in peach fruit (*Prunus persica*). *New Phytologist* 172:229-238.