

مطالعه فیلوژنی و بیان ژن‌های پلی‌آمین اکسیداز (*PAO*) در ذرت (*Zea mays L.*)

امین عابدی^۱، محمد مهدی سوهانی^{۲*} و رضا شیرزادیان خرم‌آباد

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۲۰

چکیده

پلی‌آمین‌ها به‌وسیله آنزیم‌های آمین‌اکسیداز شامل آمینو اکسیدازهای حاوی مس (*CuPAO*) و پلی‌آمین اکسیدازهای (*PAO*) وابسته به FAD به‌صورت اکسیداتیو دآمین می‌شوند. شواهد زیادی مبنی بر نقش ضروری پلی‌آمین‌اکسیدازها در رشد و نمو گیاهان مانند اندام‌زایی و پیری و نیز پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی وجود دارد. در دسترس قرار گرفتن توالی ژنوم ذرت فرصت بسیار مناسبی برای مستندسازی، گروه‌بندی و نیز مطالعات ژنومیکس مقایسه‌ای مهیا ساخته است. در این مطالعه از طریق آنالیزهای بیوانفورماتیک، *ZmPAO1* تا *ZmPAO9* در ژنوم ذرت شناسایی شد. آنالیز فیلوژنتیک نشان داد که ژن‌های *ZmPAO* همانند اورتولوگ آن‌ها در آرابیدوپسیس و برنج به سه گروه اصلی تقسیم می‌شوند. ضمن اینکه ژن‌های *PAO* ذرت ارتباط تکاملی نزدیک‌تری با ژن‌های برنج در مقایسه با آرابیدوپسیس دارند. مطالعه ساختار ژنی نشان داد که تعداد اینترون‌های *ZmPAO* از صفر تا نه متغیر است و روی چهار کروموزوم از ده کروموزوم ذرت قرار گرفته است. مضاعف شدگی تاندوم و سگمنتال موجب افزایش تعداد اعضای خانواده ژنی *PAO* در ذرت شده‌اند. با استفاده از داده‌های ریزآرایه در دسترس، پروفایل رونوشت‌برداری ژن‌های *ZmPAO* در فرآیندهای رشد و نمو ذرت ارزیابی و نتایج نشان‌دهنده نقش احتمالی آن‌ها در تنظیم نمو بود. نتایج این مطالعه اطلاعات پایه‌ای را آرایه کرد که برای مطالعات عملکردی آینده در مورد فعالیت ژن‌های *ZmPAO* در بافت‌ها، نقش آن‌ها در نمو و نیز در پاسخ به تنش‌ها مفید و موثر است.

واژه‌های کلیدی: بیوانفورماتیک، تکامل، ساختار ژن، مضاعف شدگی، همولوگ

۱- دانش‌آموخته دکتری، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

* نویسنده مسئول: msohani@guilan.ac.ir

مقدمه

بقولات نظیر نخود و عدس یافت می‌شود (Cona *et al.*, 2006). در مقابل، PAO دارای سطح بیشتری در گیاهان تک لپه است و تمایل بالایی به اسپرمین، اسپرمیدین و مشتقات آن‌ها دارد (Alcázar *et al.*, 2010).

آنزیم‌های پلی‌آمین اکسیداز گیاهی بر اساس توانایی کارکردی خود در کاتابولیسم پلی‌آمین‌ها به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند. گروه اول کاتابولیسم Spd و Spm را کاتالیز می‌کند. کاتابولیسم اسپرمین موجب تولید ۱ و ۳ دی‌آمینو پروپان (1,3-diaminopropane, DAP)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و N-(۳-آمینوپروپیل)-۴-آمینوبوتانال (N-(3-aminopropyl)-4-aminobutanal) و کاتابولیسم اسپرمیدین موجب تولید ۴-آمینوبوتانال (4-aminobutanal) می‌شود. آنزیم‌های PAO گروه دوم مسئول واکنش برگشتی پلی‌آمین‌ها هستند و توانایی تبدیل اسپرمین به اسپرمیدین و اسپرمیدین به پوترسین را دارند (Liu *et al.*, 2015). مطالعات قبلی نشان می‌دهند که گروه دیگری از پروتئین‌ها با وجود داشتن دمین *Amino_oxidase* (PF01593)، قادر به دامیناسیون پلی‌آمین‌ها نیستند و در فرآیند تغییرات پس از ترجمه هیستون‌ها در هسته نقش دارند. این پروتئین‌ها دارای دمین *SWIRM* (PF04433) نیز هستند که در میان‌کنش پروتئین-پروتئین نقش دارند (Shibaya *et al.*, 2016).

اگرچه کنترل هموستازی پلی‌آمین‌ها برای سلول ضروری است، اما به نظر می‌رسد که تنها هدف کاتابولیسم این ترکیبات، کنترل هموستازی پلی‌آمین‌ها در گیاهان نیست. پراکسید هیدروژن (H_2O_2) یک مولکول مهم در پیام‌رسانی است که طی اکسیداسیون پلی‌آمین‌ها تولید می‌شود. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که پلی‌آمین اکسیدازها به واسطه H_2O_2 در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک نقش مهمی ایفا می‌کنند. برای مثال H_2O_2 حاصل از کاتابولیسم اسپرمیدین در ورود کلسیم نقش دارد و از این طریق رشد لوله‌گرده را تنظیم می‌کند (Wu *et al.*, 2010). فرابیان ژن PAO در توتون تاثیر معنی‌داری در نمو ریشه و تمایز آوند آبکش داشته است (Ghugre *et al.*, 2015). همچنین جوانه‌زنی بذر برنج تحت تاثیر H_2O_2 حاصل از فعالیت آنزیم PAO است (Chen *et al.*, 2016). علاوه بر آن، کاتابولیسم PA در پاسخ گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نیز نقش دارد. طی تنش شوری، اکسیداسیون PAها در حفظ رشد برگ نقش دارد (Rodriguez *et al.*, 2009). H_2O_2 حاصل از کاتابولیسم پلی‌آمین‌ها موجب واکنش فوق

حیات گیاهان به‌طور مداوم توسط تنش‌های زیستی و غیرزیستی به چالش کشیده می‌شود. این تنش‌ها بر رشد، نمو، تولید و پراکنش جغرافیایی گیاهان تاثیر منفی دارند. به‌منظور زنده ماندن در شرایط نامطلوب، انواع روش‌های سازگاری و مقاومت در گیاهان ایجاد شده است. تجمع متابولیت‌هایی نظیر پلی‌آمین‌ها (PA) در سلول از جمله این روش‌ها است که ثابت شده است، نقش حفاظتی دارند (Liu *et al.*, 2015). پلی‌آمین‌ها مولکول‌های پلی‌کاتیونی آلیفاتیک با وزن مولکولی پایین هستند که در گیاهان، جانوران و باکتری‌ها یافت می‌شوند. سه گروه اصلی PA در گیاهان شامل پوترسین دی‌آمین (Putrescine, Put)، اسپرمیدین تری‌آمین (Spermidine, Spd) و اسپرمین تتراآمین (Spermine, Spm) هستند (Angelini *et al.*, 2010). علاوه بر پلی‌آمین‌های عمومی، برخی از پلی‌آمین‌ها مانند هومواسپرمیدین (Homospermidine)، نوراسپرمین (Norspermine, Nor-Spm) و ترمواسپرمین (Thermospermine, Therm-Spm) در مقادیر بسیار کم در سیستم‌های زنده از جمله گیاهان شناسایی شده‌اند (Fincato *et al.*, 2012). این ترکیبات حاوی نیتروژن در pH فیزیولوژیک دارای بار مثبت هستند و به‌این دلیل در کنش با ماکرومولکول‌های با بار منفی مانند DNA، RNA، پروتئین‌ها و فسفولیپیدها هستند و از این طریق در ساختار و کارکرد اسیدهای نوکلئیک، فعالیت آنزیم‌ها و تنظیم ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی غشاء دخالت می‌کنند (Groppa and Benavides, 2008).

حفظ هموستازی پلی‌آمین‌ها در سلول برای انجام این فرآیندها ضروری است، اما غلظت بالای PA می‌تواند برای سلول سمی باشد و بنابراین شدیداً میزان PA آزاد سلول کنترل می‌شود. غلظت PA آزاد داخل سلول از طریق اتصال آن با ترکیباتی مثل هیدروکسی‌سینامیک اسید، همی‌سلولوز و لیگنین و نیز کاتابولیسم پلی‌آمین‌ها کنترل می‌شود (Moschou *et al.*, 2008). دو آنزیم اصلی کاتابولیسم پلی‌آمین‌ها، دی‌آمین اکسیداز (CuAO, EC 1.4.3.6) و پلی‌آمین اکسیداز (PAO, EC 1.5.3.3) هستند که به ترتیب از کوفاکتورهای مس و FAD استفاده می‌کنند. آنزیم CuAO در دامیناسیون اکسیداتیو پوترسین و آنزیم PAO در دامیناسیون اکسیداتیو اسپرمیدین (Spd) و اسپرمین (Spm) نقش دارند (Angelini *et al.*, 2010). آنزیم CuAO در سطح بالایی در گیاهان دو لپه به‌ویژه گونه‌های

(Goodstein *et al.*, 2012). در روش دوم پروفایل HMM دمین *Amino_oxidase* (PF01593) از پایگاه داده Pfam (Bateman *et al.*, 2004) به دست آمد و سپس از طریق ابزار HMMsearch برای جستجوی پروتئین‌های PAO ذرت در پایگاه داده UniProtKB با پارامترهای پیش فرض استفاده شد (Finn *et al.*, 2011). آن‌گاه توالی‌های تکراری حذف و در نهایت تأیید وجود دمین *Amino_oxidase* در توالی‌های شناسایی شده با استفاده از پایگاه داده Pfam و hmmscan انجام گرفت (Finn *et al.*, 2011, 2014).

از برنامه برخط ProtComp برای تعیین جایگاه سلولی پروتئین‌ها استفاده شد. همچنین وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک (pI) پروتئین‌های PAO با استفاده از ابزار ProtParam و وبگاه ExpASY محاسبه شد (Artimo *et al.*, 2012). برای نام‌گذاری ژن‌های PAO ذرت، ابتدا پیشوند Zm از *Zea mays* و سپس PAO و در نهایت شماره‌گذاری بر اساس جایگاه ژن‌ها روی کروموزوم‌های ۱ تا ۱۰ ذرت و از بالا به پایین انجام گرفت. شکل‌های مختلف اسپیلیسینگ نیز بعد از علامت " " با اعداد مشخص شدند.

روابط تکاملی خانواده ژنی PAO در ذرت

برای بررسی روابط تکاملی خانواده ژنی PAO ذرت، هم‌ردیف‌سازی طول کامل پروتئین‌های PAO ذرت، برنج و آرابیدوپسیس با استفاده از نرم‌افزار ClustalX 2.0.8 (Larkin *et al.*, 2007) انجام و سپس با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) و بر اساس روش دورترین همسایه‌ها (N.J) درخت فیلوژنی رسم شد. صحت گروه‌بندی درخت رسم شده با آزمون بوت‌استرپ با تکرار ۱۰۰۰ بررسی شد.

ساختار ژنی، جایگاه کروموزومی و مضاعف‌شدن ژن‌های PAO ذرت

الگوی توزیع اینترون‌ها و فاز اسپیلیسینگ از طریق مقایسه توالی CDS نسبت به DNA ژنومی مربوط به هر ژن با استفاده از سرور GSDS انجام شد (Hu *et al.*, 2015). اطلاعات مربوط به جایگاه کروموزومی ژن‌ها و نیز بررسی مضاعف‌شدن پی‌درپی از طریق بخش Jbrowse وبگاه فایتوزوم (phytozome) دریافت شد (Goodstein *et al.*, 2012). ژن‌های موجود روی یک کروموزوم با فاصله حداکثر پنج ژن از هم و میزان تشابه (Similarity) بالای

حساسیت گیاهان نسبت به باکتری‌های بیماری‌زا می‌شود (Fu *et al.*, 2011). مطالعات نشان داده است که کاتابولیسم PAها در پیری القاء شده از طریق تاریکی در جو و آرابیدوپسیس موثر است (Masson *et al.*, 2017). آنزیم‌های PAO را یک خانواده ژنی کوچک چند عضوی کد می‌کند. به‌عنوان مثال، شش ژن PAO در پرتقال (*Citrus sinensis*) شناسایی شده است (Wang and Liu, 2014). همچنین، آرابیدوپسیس دارای ۵ (Takahashi *et al.*, 2010) و برنج دارای ۷ (Liu *et al.*, 2014) ژن PAO است. اخیراً نیز مشخص شده است که پنبه حاوی ۱۲ ژن PAO است (Cheng *et al.*, 2017). ذرت (*Zea mays*) از مهم‌ترین منابع غذایی بشر است و امروزه یک گیاه مدل تک‌لپه برای مطالعات بیولوژیک است. از سوی دیگر، در دسترس قرار گرفتن داده‌های ژنوم این گیاه فرصت مناسبی برای مطالعات بیوانفورماتیک فراهم کرده است (Wang *et al.*, 2015). با توجه به نقشی که آنزیم‌های PAO در رشد و نمو و پاسخ گیاهان نسبت به تنش‌ها دارند، شناسایی بیوانفورماتیک این ژن‌ها و مطالعه ویژگی‌های پروتئینی و تکاملی پلی‌آمین اکسیدازهای ذرت می‌تواند اولین گام در استفاده از ژن‌های PAO در تولید ذرت مقاوم به تنش باشد.

در این مطالعه بر اساس جستجوی پایگاه داده ژنوم ذرت، نه ژن PAO شناسایی و مشخصات پروتئین‌های رمز شده تعیین شد. همچنین جایگاه ژن‌ها روی کروموزوم‌ها و مضاعف‌شدگی مداوم (Tandem) و سگمنتال (Segmental) بین ژن‌های خانواده PAO ذرت تعیین و روابط فیلوژنتیک این ژن‌ها با ژن‌های PAO آرابیدوپسیس و برنج بررسی شد. در نهایت برای درک کارکرد ژن‌های *ZmPAO* بیان آن‌ها در مراحل نمو و بافت‌های مختلف ذرت بر اساس داده‌های ریزآرایه مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

شناسایی *in silico* ژن‌های PAO ذرت

برای شناسایی اعضای خانواده ژنی PAO ذرت از دو روش استفاده شد. در روش اول، توالی پروتئینی ژن‌های PAO برنج (Liu *et al.*, 2014) و آرابیدوپسیس (Takahashi *et al.*, 2010) به ترتیب از پایگاه داده TAIR10 و RGAP7 دریافت و با استفاده از الگوریتم tBLASTn برای شناسایی ژن‌های PAO در پایگاه داده ژنوم ذرت در وبگاه فایتوزوم (Phytozome) استفاده شد

(*al.*, 2010). در نهایت نه ژن پلی آمین اکسیداز در ژنوم ذرت شناسایی شد که به صورت *ZmPAO1* تا *ZmPAO9* نام گذاری شدند (جدول ۱). بررسی‌ها نشان داد که به علت وجود آلترناتیو اسپلایسینگ (Alternative Splicing)، این نه ژن توانایی رمز کردن ۲۰ پروتئین PAO را دارند که هر نسخه پروتئینی مربوط به هر ژن با " و عدد مربوط به آن نسخه مشخص شد (جدول ۱). وزن مولکولی این پروتئین‌ها از ۱۹/۱۴ تا ۶۷/۴۸ کیلودالتون و طول آن‌ها از ۱۷۸ تا ۶۰۲ اسید آمینه متفاوت است. همچنین نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌های PAO ذرت از ۵/۰۷ در *ZmPAO4.2* تا ۶/۶۸ در ژن‌های *ZmPAO7.1* و *ZmPAO7.4* است (جدول ۱). طول پروتئین، وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌های PAO ذرت مشابه برنج، آرابیدوپسیس، پنبه و پرتقال است.

جایگاه فعالیت پلی آمین اکسیدازهای ذرت در سیتوپلاسم، آپوپلاسم و پراکسیسوم پیش‌بینی شد. مطالعات نشان داده است که جایگاه سلولی این آنزیم‌ها با کارکرد آن‌ها در ارتباط است. آنزیم‌های PAO که واکنش نهایی کاتابولیسم پلی آمین‌ها را انجام می‌دهند، در آپوپلاست فعالیت دارند. آنزیم‌های PAO نیز که کاتالیز کننده واکنش برگشتی پلی آمین‌ها هستند، در سیتوپلاسم و پراکسیسوم فعال هستند (جدول ۱).

جایگاه کروموزومی، مضاعف شدن و ساختار ژنی

جایگاه فیزیکی ژن‌های PAO ذرت بر اساس نقطه شروع این ژن‌ها روی کروموزوم‌های ذرت مشخص شد. نه ژن *ZmPAO* به صورت غیریکنواخت روی کروموزوم‌های ۱ تا ۱۰ ذرت توزیع شده‌اند و هیچ ژن عضو *ZmPAO* روی کروموزوم‌های ۴ تا ۹ وجود ندارد (جدول ۱).

فرآیند مضاعف شدن ژن عامل اصلی تکامل یوکاریوت‌ها و ماده خام مورد نیاز برای تکامل ژن‌های جدید را ایجاد می‌کند که این ژن‌ها می‌توانند کارکرد جدیدی داشته باشند. در مقایسه با سایر یوکاریوت‌ها، نرخ مضاعف شدن در گیاهان به علت نیاز به سازگاری با محرک‌های محیطی بیشتر است (Hanada *et al.*, 2008). برای روشن شدن مکانیسم بسط خانواده *ZmPAO*، مضاعف شدن پی‌درپی و سگمنتال در این خانواده بررسی و تشابه بین آن‌ها محاسبه و بر این اساس مشخص شد که مابین ژن‌های *ZmPAO1/ZmPAO2* (تشابه ۵۳/۲ درصد)، *ZmPAO1/ZmPAO3* (تشابه ۶۱ درصد) و

۴۰ درصد به عنوان ژن‌های حاصل از مضاعف شدن پی‌درپی در نظر گرفته شدند (Hu and Liu, 2012). شناسایی مضاعف شدن سگمنتال از طریق جستجوی پایگاه داده مضاعف شدن ژنوم گیاهان (PGDD) انجام گرفت. در پایگاه داده PGDD شناسایی ژن‌های سگمنتال بر اساس شماره دسترسی ژن است و مشخص می‌کند که هر ژن با کدام ژن یا ژن‌ها رابطه سگمنتال دارد و از طریق جایجایی قطعات کروموزومی ایجاد شده است (Lee *et al.*, 2013).

بررسی دیجیتالی بیان ژن‌های PAO ذرت

آنالیز بیان ژن‌های PAO در مراحل مختلف نمو ذرت با استفاده از داده‌های ترانسکریپتوم اطلس لاین بیان اینبرد B73 ذرت (فناوری ریزآرایه NimbleGen) انجام شد (Sekhon *et al.*, 2011). داده‌های نرمال شده با روش (Robust Multi-array Average) بر مبنای لگاریتم پایه دو از پایگاه داده‌های بیانی گیاهی PLEXdb دریافت (Dash *et al.*, 2012) و جهت خوشه‌بندی داده‌های بیانی بر اساس فاصله اقلیدسی و الگوریتم دورترین همسایه‌ها (Complete Linkage) و نیز رسم نقشه حرارتی (Heat Map) از نرم‌افزار Mev4.0 استفاده شد.

نتایج و بحث

خانواده ژنی PAO در ذرت

انتشار داده‌های توالی ژنوم ذرت، ارزیابی و شناسایی ژن‌ها و روشن کردن تاریخ تکامل آن‌ها را امکان پذیر ساخته است (Zhou *et al.*, 2017). در این مطالعه با استفاده از الگوریتم tBLASTn و پروفایل HMM چهارده ژن حاوی دمین *Amino_oxidase* در ژنوم ذرت شناسایی شد. چهار ژن به شماره دسترسی *GRMZM2G030529*، *GRMZM2G019863*، *GRMZM2G059958* و *GRMZM2G149786* علاوه بر دمین *Amino_oxidase* دارای دمین *SWIRM* نیز بودند. پروتئین‌های دارای این دو دمین به عنوان دمتیلاز اختصاصی لیزین شناخته می‌شوند. جالب توجه آنکه ژنوم آرابیدوپسیس، انگور، برنج و توت فرنگی نیز حاوی چهار ژن *LSD* بودند که نشان دهنده عدم تاثیر مضاعف شدن بر گسترش این ژن‌ها است (Gu *et al.*, 2016). همچنین ژن *AC213398.3_FG002* به علت ناقص بودن دمین *Amino_oxidase* و E. value پایین حذف شد. پروتئین‌های دارای دمین ناقص یا طول کوتاه در مطالعات تکاملی و فیلوژنی مشکل‌ساز هستند (Jiang *et al.*

از کدون انجام می‌شود، در حالی که در فاز دو اسپلایسینگ در دومین نوکلئوتید بعد از کدون و در فاز صفر نیز در سومین نوکلئوتید بعد از کدون ایجاد می‌شود (Sharp, 1981). عمده تفاوت مشاهده شده در مورد نسخه‌های رونوشت هر ژن حذف اگزون در برخی از آن‌ها است (شکل ۱). برای مثال، اگزون شماره یک در رونوشت‌های *ZmPAO4.2* و *ZmPAO5.2* و اگزون آخر در *ZmPAO1.1* حذف شده‌اند. بیش‌ترین تأثیر آلترناتیو اسپلایسینگ در مورد ژن *ZmPAO7* مشاهده می‌شود، زیرا رونوشت *ZmPAO7.5* فاقد پنج اگزون انتهایی است. رونوشت *ZmPAO7.3* نیز سه اگزون ابتدایی را ندارد. باید توجه داشت که سه ژن *ZmPAO2*، *ZmPAO3* و *ZmPAO6* تنها یک سیستم اسپلایسینگ دارند. تفاوت ساختاری بین ژن‌های *PAO* ذرت نشان داد که ژن *PAO6* فاقد اینترون است، در حالی که در سایر ژن‌ها حداقل دو اینترون (*ZmPAO7.5*) وجود دارد.

ZmPAO2/ZmPAO3 (تشابه ۸۴/۳ درصد) مضاعف‌شدن پی‌درپی و بین ژن‌های *ZmPAO4/ZmPAO9* مضاعف‌شدن سگمنتال ایجاد شده است. بالا بودن درصد تشابه می‌تواند نشان‌دهنده رابطه تکاملی این ژن‌ها و ایجاد آن‌ها از طریق مضاعف‌شدن باشد.

مطالعه ساختار ژن‌ها در علوم زیستی بسیار مهم است و می‌تواند راهنمای بسیار مهم برای مشخص کردن تکامل ژن‌ها باشد. همچنین پایدار بودن ساختار ژن پیش‌شرط حفاظت‌شدگی نقش کارکردی ژن‌ها است، در حالی که تنوع در ساختار ژن برای تکامل کارکردی خانواده‌های ژنی ضروری است (Cao and Shi, 2012).

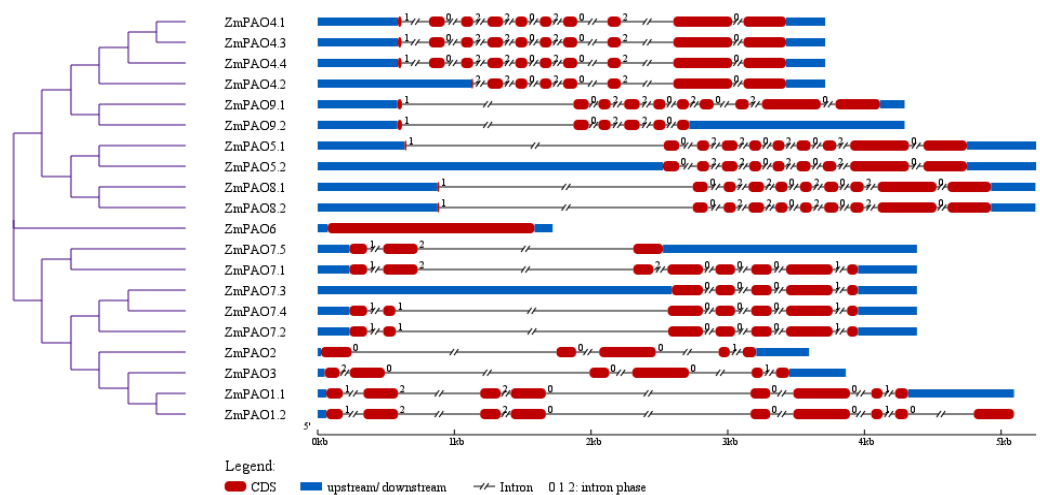
ساختار اگزون-اینترونی ژن‌های *PAO* ذرت را از دو جنبه تفاوت‌های ساختاری بین ژنی و تفاوت‌های ساختاری درون ژنی (بین نسخه‌های رونوشت مختلف هر ژن حاصل از آلترناتیو اسپلایسینگ) و نیز فاز اسپلایسینگ بررسی کرد. سه نوع فاز اسپلایسینگ بر اساس جایگاه انجام آن وجود دارد. در فاز یک اسپلایسینگ در اولین نوکلئوتید بعد

جدول ۱- اطلاعات پروتئینی خانواده ژنی پلی‌آمین اکسیداز (*PAO*) در ذرتTable 1. Protein information of polyamine oxidase (*PAO*) gene family in maize

Gene locus	Gene name	Protein name	Chromosome	Protein length	Isoelectric point	Molecular weight	Cellular localization
GRMZM2G071343	<i>ZmPAO1</i>	ZmPAO1.1	1	507	5.57	57.05527	Apoplast
GRMZM2G071343		ZmPAO1.2		602	6.11	67.48923	
GRMZM2G071217	<i>ZmPAO2</i>	ZmPAO2	1	323	5.21	37.30073	Apoplast
GRMZM2G153799	<i>ZmPAO3</i>	ZmPAO3	1	370	5.25	42.56365	Apoplast
GRMZM2G078033	<i>ZmPAO4</i>	ZmPAO4.1	2	487	5.26	53.04045	Peroxisome
GRMZM2G078033		ZmPAO4.2		414	5.07	45.50781	
GRMZM2G078033		ZmPAO4.3		487	5.26	53.04045	
GRMZM2G078033		ZmPAO4.4		487	5.26	53.04045	
GRMZM2G000052	<i>ZmPAO5</i>	ZmPAO5.1	2	483	5.83	53.58029	Peroxisome
GRMZM2G000052		ZmPAO5.2		481	5.83	53.33806	
GRMZM2G035994	<i>ZmPAO6</i>	ZmPAO6	3	504	5.44	53.94384	Cytoplasm
GRMZM2G034152	<i>ZmPAO7</i>	ZmPAO7.1	10	500	5.71	56.37089	Apoplast
GRMZM2G034152		ZmPAO7.2		396	6.68	44.65683	
GRMZM2G034152		ZmPAO7.3		313	6.47	36.41624	
GRMZM2G034152		ZmPAO7.4		396	6.68	44.65284	
GRMZM2G034152		ZmPAO7.5		199	5.45	21.52339	
GRMZM2G396856	<i>ZmPAO8</i>	ZmPAO8.1	10	482	5.6	53.36002	Peroxisome
GRMZM2G396856		ZmPAO8.2		482	5.6	53.36002	
GRMZM2G150248	<i>ZmPAO9</i>	ZmPAO9.1	10	493	5.43	53.86464	Peroxisome
GRMZM2G150248		ZmPAO9.2		175	5.94	19.14673	

و *ZmPAO3* که از طریق مضاعف شدن پی‌درپی ایجاد شده‌اند، دارای تفاوت‌هایی است. تعداد اگزون، طول ژن، طول اینترون‌ها و نیز فاز اسپلایسینگ *ZmPAO1* با دو ژن دیگر متفاوت است و فقط تفاوت دو ژن *ZmPAO2* و *ZmPAO3* در وجود نداشتن اگزون شماره یک در ژن *ZmPAO2* است (شکل ۱).

دو ژن *ZmPAO4* و *ZmPAO9* نیز که از طریق مضاعف شدن سگمنتال ایجاد شده‌اند، از نظر تعداد اگزون و فاز اسپلایسینگ مشابه هستند و فقط طول اینترون شماره یک در *ZmPAO9* بلندتر است (بدون در نظر گرفتن تفاوت‌های مشاهده شده بین نسخه‌های رونوشت هر ژن). ساختار اگزونی-اینترونی ژن‌های *ZmPAO2*، *ZmPAO1*



شکل ۱- ساختار اگزون-اینترونی ژن‌های PAO ذرت مطابق رابطه فیلوژنی آن‌ها

Figure 1. The exon-intron structure of maize PAO genes according to their phylogenetic relationships

حضور داشت و شامل سه ژن *ZmPAO6*، *OsPAO1* و *AtPAO5* بود. خوشه سه نیز شامل ژن‌های *ZmPAO1*، *ZmPAO2*، *ZmPAO3*، *ZmPAO7*، *OsPAO2* و *OsPAO6*، *OsPAO7* و *AtPAO1* بود (شکل ۲).

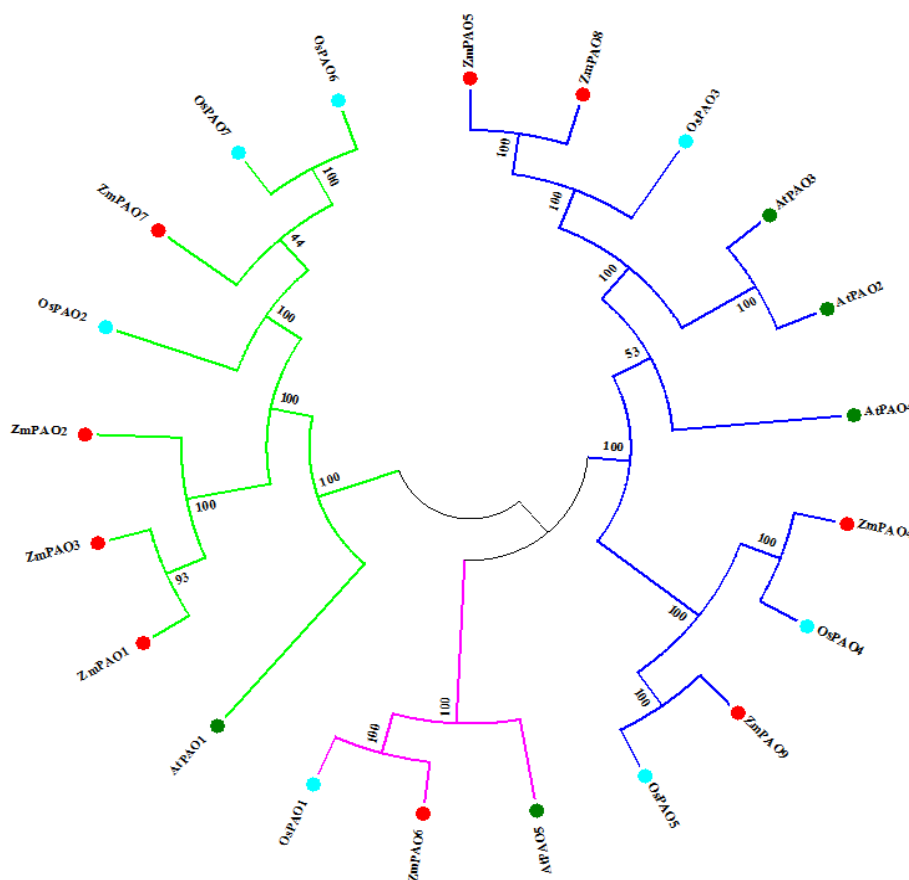
وجود رابطه تکاملی نزدیک بین برنج و ذرت که از خانواده گرامینه هستند، موجب شده است که در هر سه گروه ژن‌های PAO این دو گیاه در کنار هم قرار گیرند. ژن‌های PAO ذرت نیز که از طریق مضاعف شدن پی‌درپی ایجاد شده‌اند، باعث ایجاد زیرگروه *ZmPAO2*، *ZmPAO1* و *ZmPAO3* در گروه سه شده‌اند (شکل ۲). در گروه یک، دو ژن *ZmPAO4* و *ZmPAO9* که با روش مضاعف شدن سگمنتال ایجاد شده‌اند، اگرچه در یک زیرگروه قرار دارند، ولی هریک از آن‌ها دارای ژن اورتولوگ از برنج (*ZmPAO9/OsPAO5*، *ZmPAO4/OsPAO4*) با امتیاز بوت‌استرپ ۱۰۰ درصد هستند (شکل ۲). به نظر می‌رسد مضاعف شدن این دو ژن پیش از جدا شدن برنج و ذرت در ۵۰ میلیون سال قبل و طی تکامل ایجاد شده باشد (Swigonova et al., 2004). برای ارزیابی دقیق‌تر این

روابط فیلوژنی ژن‌های PAO ذرت

برای روشن ساختن روابط فیلوژنی ژن‌های *ZmPAO* از طریق شناسایی ژن‌های پارالوگ و اورتولوگ، درخت تکاملی بر اساس هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی کامل پروتئین‌های PAO برنج و ذرت (تک‌لپه) و آرابیدوپسیس (دولپه) بر اساس روش ادغام همسایه‌ها (Neighbor Joining) رسم شد (شکل ۲). ژن‌های اورتولوگ عموماً به ژن‌های همولوگ موجود در ژنوم‌های مختلف گفته می‌شود که از یک ژن اجدادی حاصل می‌شوند و به احتمال زیاد کارکرد مشابه دارند، در حالی که ژن‌های پارالوگ از یک ژن در داخل یک ژنوم و طی مضاعف شدن ایجاد می‌شوند و عموماً کارکرد متفاوتی دارند (Sonnhammer and Koonin, 2002). بر اساس توپولوژی درخت فیلوژنی و امتیاز بوت‌استرپ، پروتئین‌های PAO ذرت، برنج و آرابیدوپسیس به سه گروه تقسیم شدند (شکل ۲). خوشه یک بزرگ‌ترین گروه و شامل *ZmPAO9*، *ZmPAO8*، *ZmPAO5*، *ZmPAO4*، *OsPAO3*، *OsPAO4*، *OsPAO5*، *AtPAO2* و *AtPAO3* بود. در خوشه دو از هر گیاه یک ژن

در پرتقال نیز ژن *CsPAO4* با ژن‌های *OsPAO1* و *AtPAO5* در یک گروه قرار گرفت (Wang and Liu, 2014).

فرضیه، بررسی مضاعف‌شدن خانواده *PAO* در برنج و سایر گیاهان گرامینه ضروری به نظر می‌رسد. در گروه دو از هر گیاه فقط یک ژن وجود دارد. در مطالعه خانواده ژنی *PAO*



شکل ۲- رابطه فیلوژنی پروتئین‌های *PAO* ذرت، برنج و آرابیدوپسیس. هم‌ردیف‌سازی چندگانه طول کامل پروتئین‌های *PAO* توسط نرم‌افزار ClustalX انجام و درخت فیلوژنی به کمک نرم‌افزار MEGA7 بر اساس روش ادغام همسایه‌ها با بوت‌استرپ ۱۰۰۰ رسم شد. گروه‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب با رنگ‌های آبی، صورتی و سبز و پروتئین‌های *PAO* ذرت، برنج و آرابیدوپسیس به ترتیب با رنگ‌های قرمز، آبی و سبز نشان داده شده است.

Figure 2. Phylogenetic relationships among maize, *Arabidopsis* and rice *PAO* proteins. Multiple sequence alignment of *PAO* full length sequence was done using ClustalX and the phylogenetic tree was generated using MEGA7 software by the Neighbor-joining method with 1000 bootstrap replications. The groups 1, 2 and 3 are shown by blue, pink and green and the *PAO* proteins of maize, rice and *Arabidopsis* are shown by red, blue and green, respectively.

PAO فاقد اینترون در این چهار گیاه و عدم مضاعف‌شدگی، به نظر می‌رسد انتقال افقی ژن *PAO* از پروکاریوت‌ها یا رتروپوزاسیون موجب ایجاد این ژن شده باشد. به هر حال، مکانیسم ایجاد و تکامل این ژن نیاز به مطالعات بیشتر دارد. مطالعات انجام‌شده نشان می‌دهند که ژن‌های *PAO* برنج و آرابیدوپسیس که در هر یک از گروه‌های فیلوژنی قرار دارند، نقش کارکردی و جایگاه درون سلولی مشابه دارند و بنابراین می‌توان این احتمال را مطرح کرد که ژن‌های *PAO* ذرت نیز همان کارکرد اختصاصی آن گروه فیلوژنی را دارد. جایگاه

مطالعه ساختار اگزونی-اینترونی ژن *ZmPAO6* نشان داد که این ژن فاقد اینترون است (شکل ۱). مطالعه ساختار اگزونی-اینترونی ژن‌های *CsPAO4* (*Cs4g14150*)، *AtPAO5* (*LOC_Os01g51320*) و *OsPAO1* (*At4g29720*) نیز نشان داد که این ژن‌ها هم فاقد اینترون هستند. در یوکاریوت‌ها سه روش برای ایجاد ژن‌های بدون اینترون وجود دارد که شامل انتقال افقی ژن از پروکاریوت‌ها، مضاعف‌شدن ژن فاقد اینترون و رتروپوزاسیون است (Huang et al., 2015). با توجه به وجود فقط یک ژن

می‌دهند و بخش دیگر با کسب کارکرد نسبتاً متفاوت در ژنوم حفظ می‌شوند (Hundertmark and Hinch, 2008). از طرف دیگر، تفاوت الگوی بیان ژن‌های پارالوگ مضاعف‌شده می‌تواند انعکاس‌دهنده فرضیه واگرایی (divergence) باشد که بر اساس آن کارکرد جفت ژن مضاعف‌شده طی تکامل به‌صورت از دست دادن کارکرد (nonfunctionalization)، تقسیم کارکرد اصلی بین ژن‌های خواهری (subfunctionalization) و یا کسب کارکرد جدید (neofunctionalization) مشاهده شود (Duarte et al., 2006). مقایسه الگوی بیان ژن‌های *ZmPAO1*، *ZmPAO2* و *ZmPAO3* که حاصل مضاعف‌شدن پی‌درپی هستند، نشان‌دهنده تشابه الگوی بیان ژن‌های *ZmPAO1* و *ZmPAO3* است و بر حفظ کارکرد این ژن‌ها طی تکامل دلالت دارد. ژن *ZmPAO2* الگوی بیان متفاوتی نسبت به دو ژن دیگر دارد و بنابراین به احتمال زیاد نقش کارکردی متفاوتی کسب کرده است. با توجه به وجود نداشتن داده‌های بیانی ژن *ZmPAO4* نمی‌توان در مورد تفاوت‌های بیانی آن و ژن *ZmPAO9* که حاصل مضاعف‌شدن سگمنتال هستند، نتیجه‌گیری کرد.

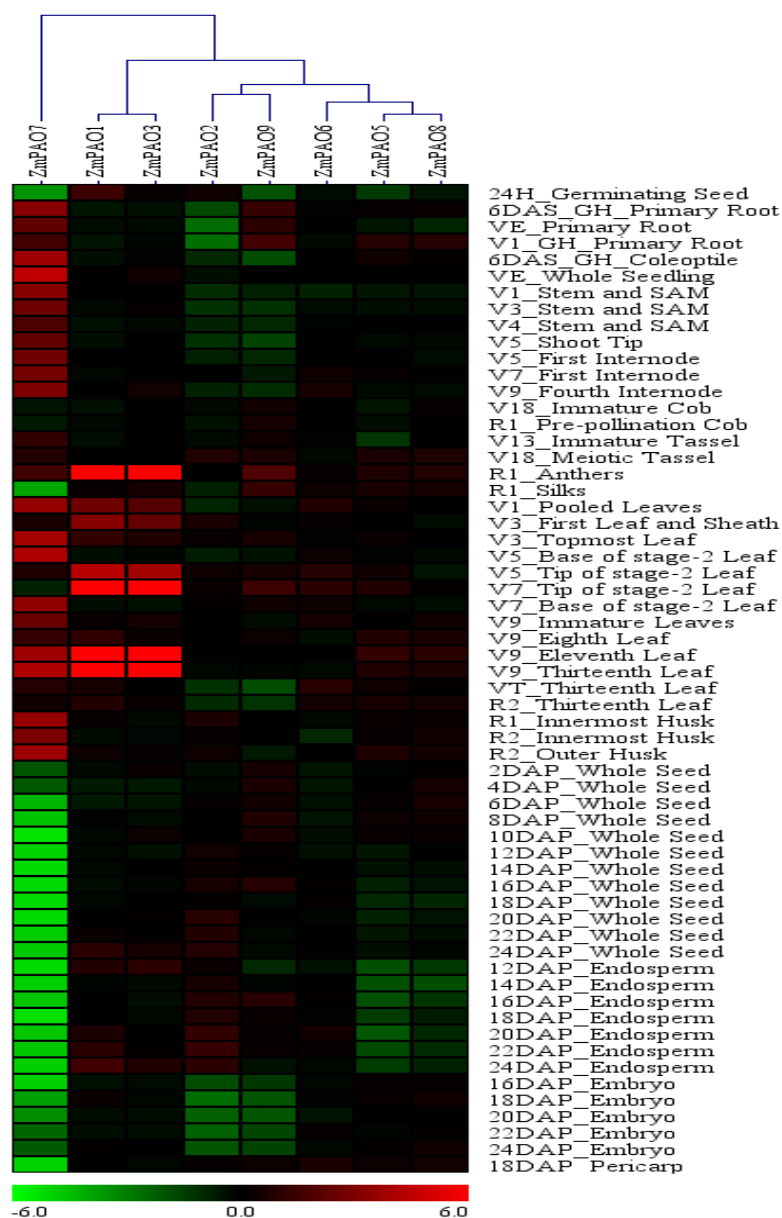
نتیجه‌گیری کلی

بر اساس روش‌های بیوانفورماتیک مورد استفاده در این تحقیق، نه ژن *ZmPAO* شناسایی شد. مطالعه فیلوژنی این خانواده نشان داد که ژن‌های *PAO* ذرت، برنج و آرابیدوپسیس به سه گروه تقسیم می‌شوند که در هر گروه نقش کارکردی و جایگاه فعالیت آن‌ها در سلول حفاظت شده است. مطالعه مکانیسم بسط خانواده ژنی *ZmPAO* نشان‌دهنده ایجاد مضاعف‌شدن پی‌درپی و سگمنتال در این خانواده است. ژن *ZmPAO6* و همولوگ‌های آن در برنج، آرابیدوپسیس و پرتقال فاقد اینترون هستند و بنابراین به احتمال زیاد بر اساس انتقال افقی ژن از پروکاریوت‌ها یا ترانسپوزاسیون ایجاد شده‌اند. الگوی بیان ژن‌های *PAO* ذرت، نشان‌دهنده نقش کارکردی آن‌ها در مراحل نمو ذرت است. الگوی بیان ژن‌های حاصل از مضاعف‌شدن پی‌درپی نیز نشان‌دهنده ایجاد کارکرد جدید برای برخی از ژن‌های *PAO* حاصل از مضاعف‌شدن پی‌درپی است. این تحقیق اولین گام در فهم نقش بالقوه ژن‌های *PAO* ذرت بود و می‌تواند در مطالعات بعدی در مورد نقش اختصاصی هر یک از این ژن‌ها در متابولیسم پلی‌آمین‌ها، مراحل نمو گیاهی و پاسخ به تنش‌ها مفید باشد.

پیش‌بینی شده برای پروتئین‌های *PAO* مشابه *PAO* برنج و آرابیدوپسیس است. بر این اساس پروتئین‌های *PAO* برنج و آرابیدوپسیس و به احتمال زیاد ذرت که در سیتوپلاسم و پراکسی‌زوم فعال هستند و در تبدیل معکوس پلی‌آمین‌ها نقش دارند، گروه یک و دو را ایجاد کرده‌اند. همچنین پروتئین‌های *PAO* برنج و آرابیدوپسیس و به احتمال زیاد ذرت، گروه سه، مرحله آخر کاتابولیسم پلی‌آمین‌ها در آپوپلاست، را کاتالیز کرده و موجب تولید H_2O_2 به‌عنوان مولکول مهم در پیام‌رسانی سلول می‌شوند (Takahashi et al., 2010; Liu et al., 2014; Chen et al., 2016).

الگوی بیان ژن‌های *PAO* ذرت در مراحل مختلف نمو

برای درک نقش کارکردی ژن‌های *PAO* ذرت، الگوی بیان این ژن‌ها در ۶۰ بافت متفاوت مربوط به ۱۱ اندام ذرت شامل بذر در حال جوانه‌زنی، ریشه اولیه، گیاهچه کامل، ساقه، مریستم انتهایی ساقه، چوب بلال، میانگره، ابریشم، تاسل و دانه‌گرده، برگ، غلاف بلال و بذر بررسی شد (Sekhon et al., 2011). برای ژن *ZmPAO4* داده بیانی یافت نشد. بر اساس داده‌های ریزآرایه، بیان ژن‌های *ZmPAO* مطابق خوشه‌بندی سلسله مراتبی به سه گروه تقسیم شد (شکل ۳). گروه یک شامل ژن‌های *ZmPAO2*، *ZmPAO5*، *ZmPAO6*، *ZmPAO8* و *ZmPAO9* بود. بیان ژن‌های این گروه در بافت‌ها و مراحل نمو نسبت به هم متنوع بود و در برخی از بافت‌ها و یا مراحل نمو الگوی بیان متضاد نشان دادند. برای مثال، در مراحل انتهایی نمو بذر و نیز آندوسپرم، بیان ژن *ZmPAO2* القاء و بیان ژن‌های *ZmPAO5* و *ZmPAO9* سرکوب شد. در ریشه نیز بیان ژن *ZmPAO9* افزایش و بیان ژن *ZmPAO2* کاهش یافت (شکل ۳). گروه دوم شامل دو ژن *ZmPAO1* و *ZmPAO3* بود و در بسیاری از بافت‌ها الگوی بیان مشابه‌ای داشت. بیان این دو ژن در دانه‌گرده، برگ، نمو بذر و آندوسپرم، القاء شد که نشان‌دهنده نقش این ژن‌ها در نمو این بافت‌ها است، اما بیان آن‌ها در ریشه، ساقه و مریستم انتهایی ساقه تغییر محسوسی نشان نداد (شکل ۳). گروه سه نیز فقط شامل ژن *ZmPAO7* بود. الگوی بیان این ژن را می‌توان به دو بخش تقسیم کرد، به‌این صورت که بیان آن در مراحل مختلف نمو بذر، آندوسپرم و جنین، بذر جوانه‌زده و ابریشم، سرکوب و در سایر بافت‌ها القاء شد (شکل ۳). در حالت کلی بعد از ایجاد مضاعف‌شدگی، بخشی از ژن‌های مضاعف‌شده در اثر تجمع جهش‌های تصادفی نقش کارکردی خود را از دست



شکل ۳- پروفایل بیان ژن‌های *PAO* ذرت بر اساس داده‌های ریزآرایه در مراحل نمو و بافت‌های مختلف. ارزش سیگنال به صورت نوار رنگی در انتهای نقشه حرارتی ارائه شده است که در آن رنگ‌های سبز، سیاه و قرمز به ترتیب نشان‌دهنده سرکوب بیان، عدم تغییر بیان و القاء بیان هستند.

Figure 3. Microarray-based expression profile of maize *PAO* genes across different tissues and development stages. Relative signals are represented by color bar shown at the bottom of heat map, thereby green, black and red colors representing down-regulation, no-change and up-regulation in expression, respectively.

References

- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C. and Tiburcio, A. F. 2010. Polyamines: Molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* 231 (6): 1237-1249.
- Angelini, R., Cona, A., Federico, R., Fincato, P., Tavliadoraki, P. and Tisi, A. 2010. Plant amine oxidases "on the move": An update. *Plant Physiology and Biochemistry* 48 (7): 560-564.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., De Castro, E. and Gasteiger, E. 2012. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research* 40 (W1): W597-W603.

- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S. and Sonnhammer, E. L. 2004.** The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 32: D138-D141.
- Cao, J. and Shi, F. 2012.** Evolution of the *RALF* gene family in plants: Gene duplication and selection patterns. *Evolutionary Bioinformatics* 8: 271-292.
- Chen, B.-X., Li, W.-Y., Gao, Y.-T., Chen, Z.-J., Zhang, W.-N., Liu, Q.-J. and Liu, J. 2016.** Involvement of polyamine oxidase-produced hydrogen peroxide during coleorhiza-limited germination of rice seeds. *Frontiers in Plant Science* 7: 1219.
- Cheng, X.-Q., Zhu, X.-F., Tian, W.-G., Cheng, W.-H., Sun, J., Jin, S.-X. and Zhu, H.-G. 2017.** Genome-wide identification and expression analysis of polyamine oxidase genes in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 129 (2): 237-249.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R. and Tavladoraki, P. 2006.** Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science* 11 (2): 80-88.
- Dash, S., Van Hemert, J., Hong, L., Wise, R. P. and Dickerson, J. A. 2012.** PLEXdb: Gene expression resources for plants and plant pathogens. *Nucleic Acids Research* 40 (D1): D1194-D1201.
- Duarte, J. M., Cui, L., Wall, P. K., Zhang, Q., Zhang, X., Leebens-Mack, J. and Altman, N. 2006.** Expression pattern shifts following duplication indicative of subfunctionalization and neofunctionalization in regulatory genes of *Arabidopsis*. *Molecular Biology and Evolution* 23 (2): 469-478.
- Fincato, P., Moschou, P. N., Ahou, A., Angelini, R., Roubelakis-Angelakis, K. A., Federico, R. and Tavladoraki, P. 2012.** The members of *Arabidopsis thaliana* PAO gene family exhibit distinct tissue-and organ-specific expression pattern during seedling growth and flower development. *Amino Acids* 42 (2-3): 831-841.
- Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R. and Mistry, J. 2014.** Pfam: The protein families database. *Nucleic Acids Research* 42 (D1): D222-D230.
- Finn, R. D., Clements, J. and Eddy, S. R. 2011.** HMMER web server: Interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Research* 39: W29-W37.
- Fu, X.-Z., Chen, C.-W., Wang, Y., Liu, J.-H. and Moriguchi, T. 2011.** Ectopic expression of *MdSPDS1* in sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) reduces canker susceptibility: Involvement of H₂O₂ production and transcriptional alteration. *BMC Plant Biology* 11 (1): 55.
- Ghugre, S. A., Tisi, A., Carucci, A., Rodrigues-Pousada, R. A., Franchi, S., Tavladoraki, P. and Cona, A. 2015.** Cell wall amine oxidases: New players in root xylem differentiation under stress conditions. *Plants* 4 (3): 489-504.
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J. and Putnam, N. 2012.** Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research* 40 (D1): D1178-D1186.
- Groppa, M. and Benavides, M. 2008.** Polyamines and abiotic stress: Recent advances. *Amino Acids* 34 (1): 35-45.
- Gu, T., Han, Y., Huang, R., McAvoy, R. J. and Li, Y. 2016.** Identification and characterization of histone lysine methylation modifiers in *Fragaria vesca*. *Scientific Reports* 6: 23581.
- Hanada, K., Zou, C., Lehti-Shiu, M. D., Shinozaki, K. and Shiu, S.-H. 2008.** Importance of lineage-specific expansion of plant tandem duplicates in the adaptive response to environmental stimuli. *Plant physiology* 148 (2): 993-1003.
- Hu, B., Jin, J., Guo, A.-Y., Zhang, H., Luo, J. and Gao, G. 2015.** GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics* 31 (8): 1296-1297.
- Hu, L. and Liu, S. 2012.** Genome-wide analysis of the *MADS*-box gene family in cucumber. *Genome* 55 (3): 245-256.
- Huang, W., Xian, Z., Kang, X., Tang, N. and Li, Z. 2015.** Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of GRAS gene family in tomato. *BMC Plant Biology* 15 (1): 209.
- Hundertmark, M. and Hincha, D. K. 2008.** LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9 (1): 118.
- Jiang, S.-Y., Ma, Z. and Ramachandran, S. 2010.** Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. *BMC Evolutionary Biology* 10 (1): 79.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016.** MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis ver. 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33 (7): 1870-1874.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H. and Lopez, R. 2007.** Clustal W and Clustal X ver. 2.0. *Bioinformatics* 23 (21): 2947-2948.

- Lee, T.-H., Tang, H., Wang, X. and Paterson, A. H. 2013.** PGDD: A database of gene and genome duplication in plants. *Nucleic Acids Research* 41 (D1): D1152-D1158.
- Liu, J.-H., Wang, W., Wu, H., Gong, X. and Moriguchi, T. 2015.** Polyamines function in stress tolerance: From synthesis to regulation. *Frontiers in Plant Science* 6: 827.
- Liu, T., Wook Kim, D., Niitsu, M., Berberich, T. and Kusano, T. 2014.** Polyamine oxidase-1 from rice (*Oryza sativa*) is a functional ortholog of *Arabidopsis* polyamine oxidase-5. *Plant Signaling and Behavior* 9 (9): e29773.
- Masson, P. H., Takahashi, T. and Angelini, R. 2017.** Editorial: Molecular mechanisms underlying polyamine functions in plants. *Frontiers in Plant Science* 8: 14.
- Moschou, P. N., Paschalidis, K. A. and Roubelakis-Angelakis, K. A. 2008.** Plant polyamine catabolism: The state of the art. *Plant Signaling and Behavior* 3 (12): 1061-1066.
- Rodriguez, A. A., Maiale, S. J., Menéndez, A. B. and Ruiz, O. A. 2009.** Polyamine oxidase activity contributes to sustain maize leaf elongation under saline stress. *Journal of Experimental Botany* 60 (15): 4249-4262.
- Sekhon, R. S., Lin, H., Childs, K. L., Hansey, C. N., Buell, C. R., de Leon, N. and Kaeppler, S. M. 2011.** Genome-wide atlas of transcription during maize development. *The Plant Journal* 66 (4): 553-563.
- Sharp, P. A. 1981.** Speculations on RNA splicing. *Cell* 23 (3): 643-646.
- Shibaya, T., Hori, K., Ogiso-Tanaka, E., Yamanouchi, U., Shu, K., Kitazawa, N. and 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): 1228-1238.
- Sonnhammer, E. L. and Koonin, E. V. 2002.** Orthology, paralogy and proposed classification for paralog subtypes. *Trends in Genetics* 18 (12): 619-620.
- Swigonova, Z., Lai, J., Ma, J., Ramakrishna, W., Llaca, V., Bennetzen, J. L. and Messing, J. 2004.** Close split of sorghum and maize genome progenitors. *Genome Research* 14 (10): 1916-1923.
- Takahashi, Y., Cong, R., Sagor, G., Niitsu, M., Berberich, T. and Kusano, T. 2010.** Characterization of five polyamine oxidase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 29 (9): 955-965.
- Wang, Q., Liu, J., Wang, Y., Zhao, Y., Jiang, H. and Cheng, B. 2015.** Systematic analysis of the maize PHD-finger gene family reveals a subfamily involved in abiotic stress response. *International Journal of Molecular Sciences* 16 (10): 23517-23544.
- Wang, W. and Liu, J.-H. 2015.** Genome-wide identification and expression analysis of the polyamine oxidase gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Gene* 555 (2): 421-429.
- Wu, J., Shang, Z., Wu, J., Jiang, X., Moschou, P. N., Sun, W. and Zhang, S. 2010.** Spermidine oxidase-derived H₂O₂ regulates pollen plasma membrane hyperpolarization-activated Ca²⁺ permeable channels and pollen tube growth. *The Plant Journal* 63 (6): 1042-1053.
- Zhou, W., Wu, J., Zheng, Q., Jiang, Y., Zhang, M. and Zhu, S. 2017.** Genome-wide identification and comparative analysis of Alfin-like transcription factors in maize. *Genes and Genomics* 39 (3): 261-275.



University of Guilan
Faculty of Agricultural
Sciences

Cereal Research
Vol. 8, No. 1, Spring 2018 (85-96)

Phylogenetic and expression analysis of polyamine oxidase (*PAO*) genes in maize (*Zea mays* L.)

Amin Abedi¹, Mohammad Mehdi Sohani^{2*} and Reza Shirzadian Khoramabad³

Received: April 19, 2017

Accepted: June 10, 2017

Abstract

Polyamines are oxidatively deaminated by amine oxidases (AOs), including copper amine oxidases (CuAOs) and FAD-dependent polyamine oxidases (PAOs). PAOs are associated with polyamine catabolism in peroxisome, apoplast and cytoplasm. In plants, increasing evidences support that *PAO* genes play an essential roles in growth and developmental processes such as organogenesis, senescence, and also responses to abiotic and biotic stresses. The availability of the maize genome sequences has provided an excellent opportunity for whole-genome annotation, classification and comparative genomics research. In this study, through bioinformatics analysis approaches, nine putative *PAO* (*ZmPAO1–ZmPAO9*) were identified in maize genome. According to Phylogenetic analysis *ZmPAOs* can be divided into three major groups as found in their orthologous in *Arabidopsis* and rice. It is also demonstrated that maize *PAO* proteins are more closely related to rice than those in *Arabidopsis*. Gene structural analysis showed that the *ZmPAOs* have zero to nine introns and they are distributed across 4 out of 10 chromosomes in maize. Duplication pattern analysis shows that segmental and tandem duplication are the main reasons for maize *PAOs* expansion. Using public microarray data, the roles of *ZmPAOs* in growth and development processes were assessed. These results have been provided evidences regarding the important functions of the gene family in maize developmental regulation. These results provide a basis for further functional characterization of *ZmPAOs* at the tissue/developmental level and in response to stresses. Using public microarray data, *ZmPAO* expression profiles strongly suggested that *ZmPAOs* have a role in growth and development processes.

Keywords: Bioinformatics, Duplication, Evolution, Gene structure, Homologue

1. Graduated Ph. D., Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

2. Assoc. Prof., Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

3. Assist. Prof., Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

* Corresponding author: msohani@guilan.ac.ir