



بررسی بیوانفورماتیکی آنزیم α -mannosidase در هلو (*Prunus persica*)

محمد حسن باقری^۱، علی صالحی ساردویی^{۲*}، حجت رضایی^۱، مصطفی خوشحال سرمست^۲
دانشجویان دکترای اصلاح و بیوتکنولوژی علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
استادیار علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
*نویسنده مسئول: alisalehisardoei@gau.ac.ir

چکیده

میزان نرم شدگی میوه‌ها در عمر پس از برداشت آنها نقش مهمی دارد. یکی از فاکتورهای موثر بر نرم‌شدگی میوه‌ها آنزیم α -mannosidase است. در این تحقیق به بررسی حضور این آنزیم با توجه به مشخصات بیوانفورماتیکی در پایگاه‌های داده‌های ژنتیکی در گیاهان مختلف پرداخته شده است، تا به توان عملکرد این آنزیم در یک گیاه را به سایر گیاهانی که میزان مشابهت ساختاری و عملکردی این آنزیم در آنها بالا می‌باشد تعیین داد. در بررسی Blast انجام شده مشخص گردید آنزیم α -mannosidase در ۱۵ گیاه بررسی شده دارای هومولوژی بوده و درصد مشابهت آن از ۹۸ درصد در گیاه *Prunus avium* تا ۷۹ درصد در گیاه *Herrania umbratica* متغییر است. در بررسی میزان خویشاوندی آنزیم با استفاده از مقایسه دو به دو توالی‌ها در Alignment و هم‌چنین بررسی دندوگرام رسم شده مشخص گردید که این آنزیم در گیاهان بررسی شده به دو شاخه اصلی و نهایتاً به پنج زیرشاخه تقسیم می‌گردند.

کلمات کلیدی: آنزیم، بیوانفورماتیک، هلو، ژن α -mannosidase.

مقدمه

آنزیم‌ها ترکیباتی هستند که سرعت واکنش‌های زیستی را افزایش می‌دهند اما در پایان واکنش دست نخورده خارج می‌شوند. آنزیم‌ها هم مانند کاتالیزورهای آزمایشگاهی و غیر آلی سرعت واکنش‌ها را با پائین آوردن انرژی فعال‌سازی افزایش می‌دهند. α -Mannosidase یک آنزیم کلیدی در فرایند تخریب N-glycan's در گیاهان و حیوانات به شمار می‌رود که در pH و دمای به ترتیب ۵ و ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت این آنزیم به حد مناسبی می‌رسد. شاخص‌های کیفیت تجاری میوه بیشتر براساس پارامترهای قابل مشاهده مانند اندازه و رنگ سطحی استوار است. این شاخص‌ها به تنهایی انتظار مصرف کننده را برآورده نمی‌کند. کیفیت ظاهری خوب میوه بایستی با طعم و بافت مناسب میوه همراه باشد (Harker et al., 2008). رسیدن میوه یکی از مراحل حیاتی رشد گیاه محسوب می‌شود. وقتی میوه‌ها به بلوغ فیزیولوژیکی می‌رسند، رشد آنها متوقف می‌شود و فرایند رسیدن آغاز می‌گردد. فرایند رسیدن منجر به تغییر در متابولیسم سلولی و نرم شدن بافت و افزایش کیفیت خوراکی آن می‌گردد (Giovannoni, 2001; Adams-Phillips et al., 2004).

بافت میوه، ویژگی اصلی کیفیت برای عمر مفید، مقاومت در برابر پاتوژن‌های پس از برداشت، حمل و نقل و جلب‌نظر مصرف کنندگان است (Vicente et al., 2007). میزان نرم شدن بافت میوه عامل اصلی تعیین‌کننده کیفیت میوه است. در برخی گیاهان مانند فلفل دلمه‌ای نرم شدن بیش از حد باعث انقباض، خشک شدن و اختلالات پاتولوژیک می‌شود که به شدت کیفیت و قابل قبول بودن محصول را کاهش داده و هم‌چنین موجب کاهش عمر مفید میوه‌ها و افزایش حساسیت نسبت به پاتوژن‌های پس از برداشت می‌شود. کاهش استحکام بافت میوه در هنگام رسیدن، نتیجه جداسازی پلیمرهای دیواره سلولی است. این موضوع ناشی از اثر متقابل آنزیم‌ها مانند هیدرولازهای پلی‌ساکارید، ترانس‌گلیکوزیدها و پروتئین‌های محکم‌کننده دیواره سلولی مانند اکسیپانسین است. (Brummel, 2006). تاکنون تلاش‌های زیادی برای کنترل رسیدن و نرم شدن میوه به وسیله کاهش بیوسنتز اتیلن صورت گرفته است اما این روش‌ها در خصوص میوه‌های نافرازگرا که طی رسیدن به اتیلن پاسخ نمی‌دهند مناسب نبوده است.



میوه‌های نافرزاگرا بر اساس الگوهای تولید دی اکسید کربن و تولید اتیلن در طی رسیدن طبقه‌بندی می‌شوند. آنزیم α -Man در هنگام رسیدن بسیاری از میوه‌ها (Jagadeesh and Prabha, 2002; Jagadeesh and Prabha, 1997; Priya Sethu and Prabha, 2004) در سطوح بالا حضور دارد. با این حال، عملکرد مولکولی آن هنوز در یک میوه‌های نافرزاگرا روشن نشده است. α -Man به عنوان هیدرولیز کننده پیوندهای گلیکوزیدی بین کربوهیدراتها و همچنین بین کربوهیدراتها و همچنین بین کربوهیدراتها و هم‌چنین بین کربوهیدراتها و غیر کربوهیدراتها شناخته شده اند. α -Man، عضو خانواده ی گلیسوزیل هیدرولاز (GH)، پیوند α -مننوزی پایدار را از هر دو نوع منیزیم بالا و N-glycans نوع پیچیده ی گیاهی که در گلیکوپروتئین‌ها وجود دارد، جدا می‌کند (Hossain et al., 2009). در مطالعه‌ای نقش α -Man در رشد و رسیدن میوه‌های کلم پیچ مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده شد که سرکوب‌کننده RNAi مداخله‌گر که نقش مهارکنندگی آنزیم α -Man را بازی می‌کند منجر به افزایش طول عمر میوه می‌شود. نتایج نشان داد که دستکاری پردازش N-گلیکان می‌تواند از اهمیت استراتژیک برای کاهش تلفات پس از برداشت در هر دو نوع میوه فراز گرا و نافرزاگرا باشد.

مواد و روش‌ها

تعیین توالی: در اولین مرحله برای بررسی آنزیم نیاز به تعیین توالی آن می‌باشد. برای این منظور از سایت NCBI به آدرس: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/731576> توالی آنزیم α -mannosidase که یک پروتئین می‌باشد، استخراج گردید. توالی بدست آمده برای آنزیم α -Mannosidase در گیاه هلو به شرح زیر است:

Alpha-mannosidase *Prunus persica*

```
>tr|L7RZF3|L7RZF3_PRUPE Alpha-mannosidase OS=Prunus persica OX=3760 GN=PRUPE_3G313300 PE=2 SV=1
MAIRLVFCCLLILVGFLVADSKFMVYNTSQGIVPGKINVHLVPHTHDDVGVWLTVDQYYVGSNNSIQGACVQNVLDLVPALLA
DKNRKFIYVEQAFFQRWWRDQSEAVQSIVKQLVSSGQLEFINGGMMCMHDEAATHYIDIIDQTTLGHFRFIKKEFDVTPRIGWQIDPF
GHSAVQAYLLGAEVGFDSLFFGRIDYQDRDKRKNDKSLFVWQGSKSLGSSAQIFSGAFPKNYEPSPGFYFEVNDSDSPIVQDDITLF
DYNVQDRVNNFVAAAQANITRTDHIMWTMGTFDKYQYAHTWFRQMDKLIHYVVKDGRVNALYSTPSIYTDKAYATNESWPI
KTDDFFPYADRTNAYWTGYFTSRPALKYYVRTMSGYLLAARQLEFLKGRINSGLNTDSLADALAIHQHDAVTGTGTEKQHVAND
YAKRLSIGYTEAEQLVATSLAHLVESASYTGSNPTTEFQQCPLLNISYCPAAEVNLSQGGKQLIVVVYNSLWGRKNDVIRIPVINED
VTVQDSEGREIESQLLPLDDAHVGLRNYHVKA YLGRTPNTPNYWLAFVTVSPPLGFSTYTISDAKAGACSTRSSVYTFQGREKS
TVEVGQGNVKTFTDQGKMTNIVNRRSLVEELVEQSYFYTA YNGSSDEAPLIPQNSGAYVFRPNTGFLINPGEKASFTVMRGPPI
DEVHQHINSWIYQITRLHKEKEHVEVEFIVGPIPIDDGTGKEVVTQIATTMATNKTFYTDNSGRDFIKRIRDYR TDWDLKVHQPIAG
NYYPINLGIYMQDNRAEFSVLVDRSIGSSSTVDGQIDMLHRRLLLDSDRGVAEALNETVCVPNDCTGLRIQGGKIFYFRIDPMGDGA
KWRRSFGQEIYSPLLLAFAEQDGDNWNKSHVTTFSVGVGSS YSLPDNVALITLQELDDGKVLRLAHLYEIGEDKDLVSMANVELK
QLFPRKKIGEVTEMNLSANQERAEMEKKRLVWVVEEGSAEAKVVRGGRVDPKLVVELGPMIEIRTFLEIFKQRFHRDMADA
```

Blast: پس از اخذ توالی پروتئین به منظور پیدا کردن این آنزیم در گیاهان دیگر عملیات Blast انجام شد. این کار با سایت NCBI به آدرس <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> صورت گرفت. در این عملیات پس از انجام Blast توالی ۱۵ گیاهی که بیشترین شباهت را داشتند (E value کمتری داشتند) دریافت شد. در هنگام اخذ توالی‌های مذکور بخش توالی‌های کد کننده (CDS) دریافت و و با فرمت FASTA ذخیره گردید.

Alignment: پس از دریافت توالی‌های آنزیم در گیاهان مختلف با استفاده از گزینه Alignment نسبت به مقایسه توالی‌ها به صورت ردیف به ردیف توالی‌ها بین پانزده گیاه انتخاب شده اقدام گردید. برای انجام عملیات Alignment از نرم افزار تولوز به آدرس: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> مراجعه و در کادر مورد نظر توالی‌های ذخیره شده در فرمت FASTA را جایگذاری و مقایسه بین آنها صورت گرفت.

TREE: ساختار درختی با استفاده از نرم افزار تولوز ترسیم گردید. برای درک عمیق تر عملکرد ژن α -mannosidase و ژن‌های مرتبط در مسیر میزان نرم شدگی میوه‌ها در عمر پس از برداشت، رسم شبکه ژنی با استفاده از بانک اطلاعاتی STRING انجام شد.

نتایج و بحث



با توجه به اینکه پروژه توالی‌یابی ژنوم گیاه هلو از تیره گل‌سرخیان (*Prunus persica*) به پایان رسیده است، می‌توان با آنالیز نواحی تنظیمی آن‌ها کارکرد دقیق‌تری را مشخص کرد. در مرحله بعد با انتقال ژن‌های مناسب به گیاهان زود گلده یا دیر گلده، عملکرد را افزایش داده و مقاومت به تنش‌های زنده و غیر زنده را بالاتر برد.

در بررسی Blast انجام شده مشخص گردید آنزیم α -mannosidase در ۱۵ گیاه بررسی شده دارای هومولوژی بوده و درصد مشابهت آن از ۹۸ درصد در گیاه *Prunus avium* تا ۷۹ درصد در گیاه *Herrania umbratica* متغیر است. مشابهت در توالی می‌تواند نشانه مناسبی از مشابهت در ساختار و مشابهت در عملکرد باشد (مراد پور و قاسمیان، ۱۳۹۳). به نظر می‌رسد با این تفسیر می‌توان در خصوص نحوه عملکرد این آنزیم در گیاهان دیگر بررسی شده اظهار نظر نمود. فرایند نرم شدن و فروپاشی پلیمرهای دیواره سلولی در این گیاهان تا حدودی مشابه با هلو بوده و در خصوص افزایش عمر پس از برداشت آنها می‌توان اقدامات لازم را انجام داد. اگر چه فاکتورهای موثر بر عمر پس از برداشت میوه‌های فرازگرا و نافرزگرا متفاوت است، اما در خصوص نحوه عملکرد آنزیم α -mannosidase در هر دو گروه میوه مشابهت دیده می‌شود. در بررسی میزان خویشاوندی آنزیم با استفاده از مقایسه دو به دو توالی‌ها در Alignment و هم‌چنین بررسی دندوگرام رسم شده مشخص گردید که این آنزیم در گیاهان بررسی شده به دو شاخه اصلی و نهایتاً به پنج زیرشاخه تقسیم می‌گردند.

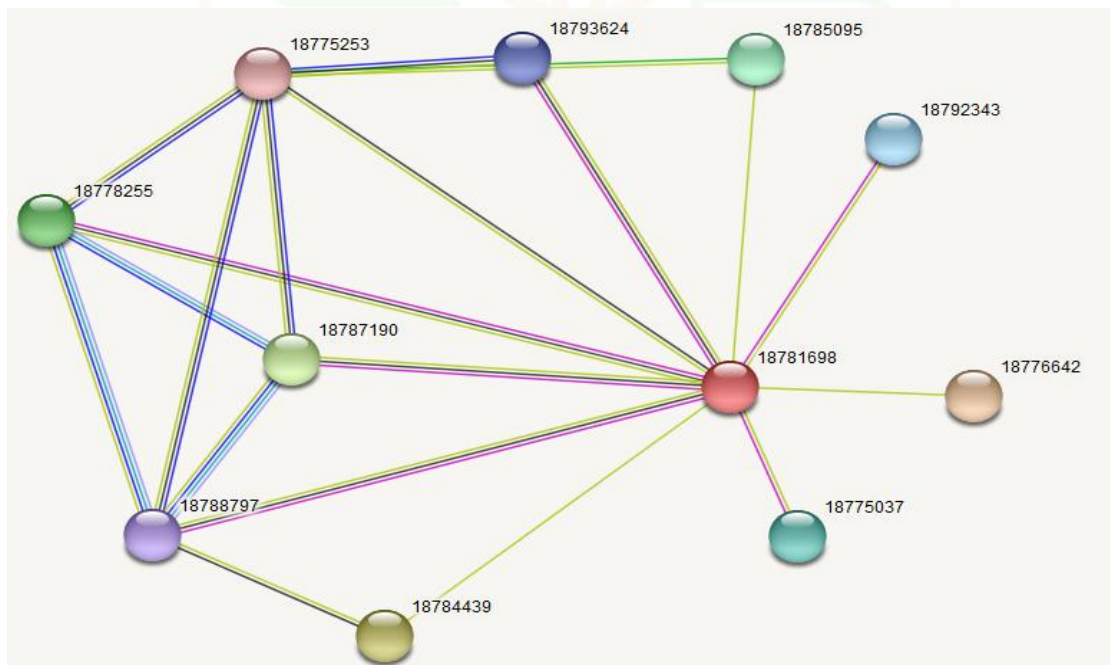
بیوانفورماتیک حوزه‌ای از علم است که در آن زیست‌شناسی، آمار، کامپیوتر و فناوری اطلاعات با هم آمیخته شده و نظام علمی جدیدی را ایجاد نموده است. هدف نهایی کشف چشم‌اندازهای جدید زیست‌شناختی و ایجاد دور نمایی کلی است که بتوان در آن جریات اصول زیست‌شناختی را از هم تمایز نمود (Vassilev et al., 2005). نقش بیوانفورماتیک در پشتیبانی از علوم زیستی برای جمع‌آوری تفسیر و مدیریت مقادیر زیادی از داده‌ها زیست‌شناختی امکان پذیر شده است. این داده‌ها در قالب توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی، دومین‌های پروتئینی و ساختارهای پروتئینی و الگوهای بیان ژن‌های مسیره‌های متابولیکی و بیوشیمیایی می‌باشند (Dagostino et al., 2005).

جدول ۱- BLAST ژن α -mannosidase در گیاه هلو با استفاده از سایت NCBI

Description	Max score	Total score	Query cover	E valSue	Ident	Accession
probable alpha-mannosidase At5g13980 [Prunus persica]	2137	2137	100%	0.0	100%	XP_007214917.1
PREDICTED: alpha-mannosidase isoform X1 [Prunus mume]	2111	2111	100%	0.0	99%	XP_008231241.1
probable alpha-mannosidase At5g13980 isoform X1 [Prunus avium]	2099	2099	100%	0.0	98%	XP_021822986.1
alpha-mannosidase [Pyrus x bretschneideri]	1924	1924	98%	0.0	90%	AGR44468.1
PREDICTED: probable alpha-mannosidase At5g13980 [Pyrus x bretschneideri]	1921	1921	99%	0.0	89%	XP_009378044.1
PREDICTED: alpha-mannosidase isoform X2 [Prunus mume]	1912	1912	91%	0.0	98%	XP_008231243.1
LOW QUALITY PROTEIN: probable alpha-mannosidase At5g13980 [Rosa chinensis]	1878	1878	98%	0.0	88%	XP_024182243.1
hypothetical protein PRUPE_3G313300 [Prunus persica]	1869	1869	87%	0.0	100%	ONI20069.1

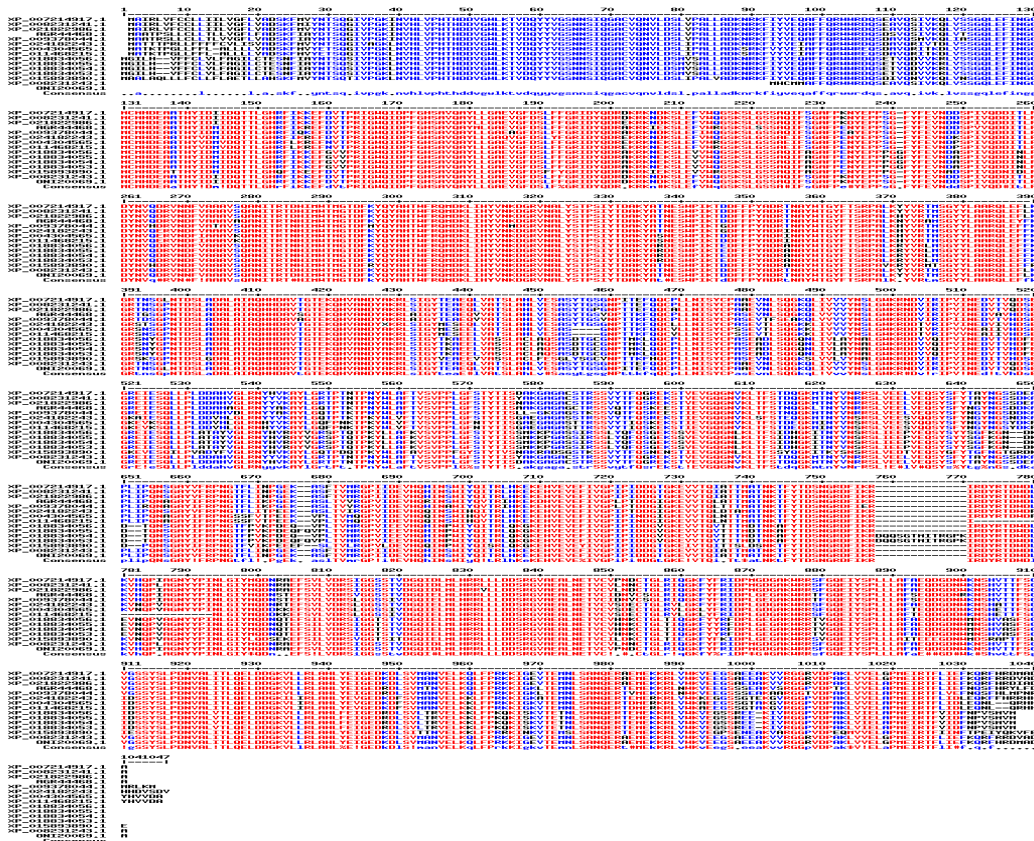


PREDICTED: alpha-mannosidase isoform X1 [Fragaria vesca subsp. Vesca]	1820	1820	97%	0.0	85%	XP_004304565.1
PREDICTED: alpha-mannosidase isoform X2 [Fragaria vesca subsp. Vesca]	1763	1763	97%	0.0	83%	XP_011468215.1
PREDICTED: probable alpha-mannosidase At5g13980 isoform X4 [Juglans regia]	1759	1759	98%	0.0	82%	XP_018834056.1
PREDICTED: probable alpha-mannosidase At5g13980 isoform X3 [Juglans regia]	1754	1754	98%	0.0	82%	XP_018834055.1
PREDICTED: probable alpha-mannosidase At5g13980 isoform X2 [Juglans regia]	1750	1750	98%	0.0	81%	XP_018834054.1
PREDICTED: probable alpha-mannosidase At5g13980 isoform X1 [Juglans regia]	1745	1745	98%	0.0	81%	XP_018834053.1
probable alpha-mannosidase At5g13980 isoform X2 [Ziziphus jujuba]	1725	1725	98%	0.0	81%	XP_015893890.1
probable alpha-mannosidase At5g13980 isoform X1 [Ziziphus jujuba]	1721	1721	98%	0.0	80%	XP_015893889.1
probable alpha-mannosidase At5g13980 [Herrania umbratica]	1707	1707	99%	0.0	79%	XP_021298038.1
probable alpha-mannosidase At5g13980 isoform X1 [Hevea brasiliensis]	1703	1703	99%	0.0	80%	XP_021663060.1

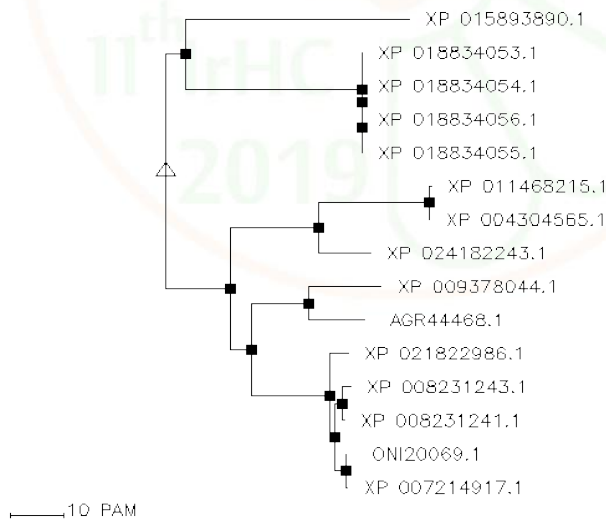


شکل ۱- ترسیم شبکه ژنی درگیر در مسیر میزان نرم شدگی میوه‌ها در عمر پس از برداشت در ارتباط با ژن α -mannosidase در گیاه هلو با استفاده از سایت STRING

در این راستا بررسی میانکنش α -mannosidase با پروتئین‌های دیگر و شناسایی شبکه‌های ژنی درگیر در مسیر گلدهی منجر به شناسایی ژن‌های جدید دیگری خواهند شد و افق دید بیولوژیکی ما را در شناسایی جنبه‌های مختلف مسیر گلدهی وسیع تر خواهد کرد.



شکل ۲- Alignment ژن α -mannosidase در گیاه هلو با استفاده از نرم افزار Toulouse



شکل ۳- ترسیم کلاستر ژنی درگیر در مسیر میزان نرم شدگی میوه‌ها در عمر پس از برداشت در ارتباط با ژن α -mannosidase در گیاه هلو با استفاده از نرم افزار Toulouse

هر چقدر دو ژن شباهت بیشتری به هم داشته باشند به عبارتی درصد خلوص آنها بیشتر و آسیب‌پذیری آنها بیشتر است، پایداری ژنتیکی در برابر عوامل نامساعد محیطی (تنش‌های زنده و غیر زنده). ولی هر چقدر ژنها اختلاف ژنتیکی بیشتری نسبت به هم داشته باشند تفاوت ژنتیکی بیشتر است، آسیب‌پذیری ژنتیکی کمتر است، پایداری یا مقاومت ژنتیکی بهتری در برابر عوامل نامساعد محیطی دارند.



ژنهایی که در یک خوشه قرار دارند، انتظار بر این است که این دسته از ژنها از نظر برخی ویژگی‌ها بعنوان (شباهت ژنی) در یک گروه قرار بگیرند و هر چقدر ژنها اختلاف بیشتری داشته باشند در برنامه‌های اصلاحی تلاقی آنها نتیجه مطلوبتری دارد. هر چه ژن‌ها شباهت بیشتری نسبت به هم داشته باشند در برنامه‌های اصلاحی نتیجه ضعیف تری رو به همراه دارند.

منابع

- مرادپور ز، ع، قاسمیان. ۱۳۹۴. بیوانفورماتیک به زبان ساده، انتشارات خانه زیست شناسی تهران. ۵۰۳.
- Adams-Phillips L, Barry C and Giovannoni J. 2004. Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends in Plant Science*. 9: 331–338.
- D'Agostino, D., M. Aversano and M. L. Chiusano, 2005. ParPEST: A pipeline for EST data analysis based on parallel Computing. *BMC Bioinformatics*. 6: 1-9.
- Harker FR, Redgwell RJ, Hallett IC, Murray SH, Carter G. 1997. Texture of fresh fruit. *Horticultural Reviews*. 20: 121–224.
- Giovannoni J. 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52: 725–749.
- Giovannoni JJ. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*. 16: 170–180.
- Vicente AR, Saladie M, Rose JKC, Labavitch JM. 2007. The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87:1435–1448.
- Vassilev, D., J. Leunissen, A. Atanassov, A. Nenov and G. Dimov, 2005. Application of bioinformatics in plant breeding. *Biotechnol. Bitechnol.Eq*. 19: 139-152.

Bioinformatics study of α -mannosidase enzyme in peach (*Prunus persica*)

Mohammad Hassan bagheri, Ali Salehi Sardoei^{1*}, Hojat Rezaei and Mostafa Khoshal Sarmast

¹PhD student Horticultural Science, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran.

²Department of Horticulture, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran..

*Corresponding Author: alisalehisardoei@gau.ac.ir

Abstract

The degree of softening fruits in post-harvest life is plays important. One of the factors affecting on softening fruits is the α -mannosidase enzyme. In this research, this enzyme the bioinformatic of genetic databases in different plants was studied, generalized the ability of the enzyme function in one plant to other plants with a high level of structural and functional similarity. In the Blast study, the α -mannosidase enzyme was homologous in 15 studied plants and its similarity varied from 98% in *Prunus avium* to 79% in *Herrania umbratica*. In the study of the relative kinship of the enzyme by comparing two sequences in the Alignment and also drawing a dentogram, it was determined that the enzyme in the studied plants was divided into two main branches and finally into five subgroups.

Keywords: Enzyme, Bioinformatics, Peach, α -mannosidase gene