ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲
صفحه ۹۰- ۷۹

مطالعه موقعیت اینترون‌ها در ژن‌های تیوردوکسین انگور

Analysis of introns position in grape *thioredoxin* genes

رضا حیدری جاپلقی[۱]، رحیم حداد*[۲] و قاسمعلی گروسی[۳]

۲،۱ و۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیاران، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

Heidari Japelaghi R[1], Haddad R*[2], Garousi GA[3]

1,2,3. Graduate Student and Assistant Professors, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: raheemhaddad@yahoo.co.uk

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۷ – تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۴)

چکیده

قطعات DNA ژنومی و ORF یک ژن تیوردوکسین *h*، تحت عنوان VvCxxS2، از بافت حبه انگور جداسازی و همسانه‌سازی گردیدند. قطعه DNA ژنومی VvCxxS2 حاوی دو اینترون در موقعیت‌هایی مشابه با ژن‌های تیوردوکسین *h* انگور و گیاهان عالی بوده و اتصالات اینترون- اگزون آن همانند ژن‌های گیاهان عالی از قانون GT-AG تبعیت می‌نماید. بررسی موقعیت اینترونی نشان داد که دو اینترون از ژن تیوردوکسین کلامیدوموناس و یک اینترون از ژن تیوردوکسین مهره‌داران در موقعیتی مشابه با اینترون‌های ژن‌های تیوردوکسین‌های *f* و *h* گیاهان عالی قرار گرفته‌اند که به احتمال قوی یک خاستگاه اولیه را برای جلبک کلامیدوموناس، تیوردوکسین‌های *f* و *h* گیاهان عالی و مهره‌داران پیشنهاد می‌نماید. بررسی موقعیت اینترونی ژن‌های تیوردوکسین *o* نشان داد که این ژن‌ها دستخوش یک تکامل دیرهنگام شده و در مقایسه با تیوردوکسین‌های *f* و *h*، الگوی متفاوتی از تکامل را دارا می‌باشند. موقعیت اینترون‌ها در ژن‌های تیوردوکسین‌های *m*، *p*، *x* و *y* نیز مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج بدست آمده نشان می‌دهند که این ژن‌ها دارای یک اینترون بین توالی پپتید انتقالی و پروتئین بالغ بوده و اینترون‌های خود را در طی یک تکامل دیرهنگام بدست آورده‌اند. در مجموع، نتایج بدست آمده در این بررسی نشان می‌دهد که تیوردوکسین-های *f*، *h* و *o* منشأ یوکاریوتی و تیوردوکسین‌های *m*، *p*، *x* و *y* منشا پروکاریوتی داشته و الگوی متفاوتی از تکامل را نشان می‌دهند.

واژه‌های کلیدی

**انگور،
اینترون،
تکامل،
تیوردوکسین،
کلامیدوموناس**

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

تیوردوکسین‌ها (Trxs) پروتئین‌هایی کوچک (۱۲ تا ۱۳ کیلو دالتون) و مقاوم در برابر حرارت هستند که در تنظیم ردوکس سلولی دخالت دارند (Gelhaye et al. 2005). این پروتئین‌ها به فراوانی در تمام موجودات زنده از پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت های عالی یافت شده و تنوع گسترده‌ای را در موجودات فتوسنتز کننده نشان می‌دهند (Gelhaye et al. 2004). برای مثال، حداقل ۴۸ ژن کد کننده تیوردوکسین و شبه تیوردوکسین در ژنوم توالی یابی شده گیاه مدل آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) شناسایی شده است (Meyer et al. 2008). نکته جالب در مورد تیوردوکسین‌ها این است که آن‌ها دارای یک ساختار سه‌بعدی کاملاً پایدار می‌باشند که تحت عنوان پیچ و تاب‌خوردگی مختص تیوردوکسین‌ها (Thioredoxin Fold) نامیده شده و در تمام موجودات زنده از پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت‌ها از قبیل: جلبک-ها، گیاهان عالی و مهره‌داران مشاهده می‌شود (Maeda et al. 2008).

گیاهان عالی حاوی انواع مختلفی از ژن‌های تیوردوکسین می‌باشند که عبارتند از: تیوردوکسین‌های کلروپلاستی *f*، *m*، *x*، *y* و *z*، تیوردوکسین‌های میتوکندریایی *o*، تیوردوکسین‌های شبکه آندوپلاسمی *s* و تیوردوکسین‌های *h* (Gelhaye et al. 2004; Alkhalfioui et al. 2008; Meng et al. 2010). تیوردوکسین‌های *m*، *x* و *y* منشأ پروکاریوتی داشته اما تیوردوکسین‌های *f*، *h* و *o* ویژه موجودات یوکاریوتی می‌باشند (Gelhaye et al. 2004). تیوردوکسین‌های کلروپلاستی در هسته کد شده و به وسیله فردوکسین و آنزیم فردوکسین- تیوردوکسین ردوکتاز (FTR) احیاء می‌شوند (Lemaire et al. 2007)، در حالی که احیاء تیوردوکسین‌های *h*، *o* و *s* توسط NADPH و آنزیم NADPH-تیوردوکسین ردوکتاز (NTR) انجام می‌شود (Gelhaye et al. 2004; Alkhalfioui et al. 2008). تیوردوکسین‌های *h* بر اساس بررسی ساختار اولیه پروتئینی و موقعیت زیرسلولی به سه زیرگروه مختلف تقسیم‌بندی می‌شوند (Gelhaye et al. 2004). اعضای زیرگروه‌های I و II توسط آنزیم NTR احیاء شده، در حالی که احیاء اعضای زیرگروه III به سیستم گلوتاتیون/گلوتاردوکسین وابسته می‌باشد (Gelhaye et al. 2003a).

خانواده چند ژنی تیوردوکسین‌ها به طور وسیع در گیاهان مختلف، به ویژه گیاه مدل آرابیدوپسیس (*A. thaliana*) مورد بررسی قرار گرفته است. در پژوهشی، موقعیت اینترون و اگزون شش قطعه ژنومی کد کننده تیوردوکسین *h* از گیاه مدل آرابیدوپسیس و قطعات ژنومی کد کننده تیوردوکسین‌های *m* و *f* از گیاه نخود فرنگی (*Pisum sativum*) مورد بررسی قرار گرفته و نتایج بدست آمده نظریه یوکاریوتی بودن تیوردوکسین‌های *h* و *f* و پروکاریوتی بودن تیوردوکسین *m* را قویاً تایید نمود (Sahrawy et al. 1996). در صنوبر (*Populus trichocarpa*)، سه توالی کد کننده تیوردوکسین *h* از کتابخانه EST بافت‌های برگ و ریشه جداسازی و همسانه‌سازی شده و بررسی ویژگی‌های کاتالیتیکی پروتئین‌های کد شده آن‌ها نشان داد که این آیزوفرم‌ها حاوی توالی جایگاه فعال متفاوت بوده و به زیرگروه‌های مختلفی تعلق دارند (Gelhaye et al. 2003b). بررسی فعالیت کاتالیتیکی ژن *AtTRXh5* در گیاه آرابیدوپسیس نشان داد که این ژن برخلاف سایر ژن‌های تیوردوکسین *h* آرابیدوپسیس، در اثر زخم‌شدگی، پیری، ریزش و عامل بیماریزای باکتریایی *Pseudomonas syringae* به میزان زیادی القاء شده و احتمالا نقش مهمی در واکنش به تنش‌های اکسنده و عوامل بیماریزا دارد (Laloi et al. 2004). همچنین بررسی فرآیند جوانه‌زنی بذور غلات نشان داده است که با دخالت تیوردوکسین‌های *h*، پروتئین‌های موجود به شکل اکسید شده در بذور خشک و رسیده، پس از جذب آب توسط بذر به حالت احیاء شده درآمده و موجب جوانه‌زنی بذر می‌شوند (Alkhalfioui et al. 2007).

تاکنون پژوهشی در زمینه بررسی موقعیت اینترون- اگزون ژن‌های تیوردوکسین در گیاه انگور (*Vitis vinifera* L.) انجام نشده و این اولین پژوهش در این زمینه می‌باشد. در این مطالعه، قطعات DNA ژنومی و ORF یک ژن کد کننده تیوردوکسین نوع *h*، تحت عنوان Vv*CxxS2*، متعلق به زیرگروه III از بافت حبه انگور عسکری (*V. vinifera* L. cv. Askari) همسانه‌سازی و توالی‌یابی شده و موقعیت اینترون‌های آن با ژن‌های تیوردوکسین *h* انگور و

Archive of SID
www.SID.ir

ژن‌های تیوردوکسین از سایر موجودات، به ویژه گیاه مدل آرابیدوپسیس مورد مقایسه قرار می‌گیرد. همچنین با بررسی موقعیت اینترون‌ها در ژن‌های تیوردوکسین‌های *f*، *m*، *o*، *p*، *x* و *y* نشان می‌دهیم که تیوردوکسین‌های *f*، *h* و *o* منشأ یوکاریوتی و تیوردوکسین‌های *m*، *p*، *x* و *y* منشأ پروکاریوتی داشته و الگوی متفاوتی از تکامل را نشان می‌دهند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و نمونه برداری

بافت حبه گیاه انگور عسکری (*V. vinifera* L.cv. Askari) در مرحله ترش- شیرین (Veraison) (Heidari et al. 2010) از مزارع انگور در ایستگاه تحقیقات انگور تاکستان، به میزان یک گرم توزین، درون ورقه‌های آلومینیومی بسته‌بندی شده و بلافاصله درون ازت مایع تثبیت گردید. نمونه‌ها سریعاً به آزمایشگاه انتقال داده شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده، نگهداری شدند.

استخراج اسیدهای نوکلئیک و سنتز رشته اول cDNA

استخراج DNA ژنومی و RNA کل به روش Heidari et al. (2011) انجام شده و رشته اول cDNA با استفاده از ۵ µg محلول RNA کل تیمار شده با آنزیم RNase-free DNase I (Fermentas)، آنزیم نسخه‌بردار معکوس RevertAid™ M-MuiV (Fermentas) و آغازگرهای $Oligo\ (dT)_{18}$ (Qiagen) سنتز شد. ترکیب هر واکنش نسخه‌برداری شامل ۵۰ mM Tris-HCl (pH ۸/۳)، ۵۰ mM KCl، ۴ mM $MgCl_2$، ۱۰ mM dithiothreitol، ۵۰ ng primer $Oligo\ (dT)_{18}$، ۵۰۰ µM از هر dNTP و سر انجام ۲۰۰ units RevertAid™ M-MuLV RT بود. واکنش نسخه-برداری در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انجام و عمل غیر فعال‌سازی آنزیم نسخه‌بردار معکوس (RT) در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه صورت گرفت. بدین ترتیب از رشته اول مولکول cDNA مولکول RNA-DNA ساخته شده به عنوان الگو در واکنش RT-PCR استفاده شد.

طراحی آغازگرهای اختصاصی و واکنش PCR

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) به منظور تکثیر ژن Vv*CxxS2* با استفاده از آنزیم *Pfu* (Fermentas)، آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی و DNA ژنومی (تیمار شده با RNase A) یا cDNA سنتز شده (با RNA کل تیمار شده با DNase I) به عنوان الگو انجام شد. آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی بر اساس انتهای ′۵ و ′۳ چارچوب باز خواندنی توالی Vv*CxxS2* (با شماره دستیابی EE089310 موجود در پایگاه اطلاعات توالی GenBank در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) با استفاده از نرم‌افزار Oligo. V5 طراحی شدند. آغازگرهای اختصاصی شامل سه نوکلئوتید اضافی و جایگاه شناسایی آنزیم برشی *Bam*HI در انتهای ′۵ بودند که توسط شرکت Metabion آلمان سنتز شدند. از آغازگر رفت (VvCxxSF)؛ با توالی 5'-tacggatccATGGAAAATCAGGAGCCG-3' و آغازگر برگشت (VvCxxSR)؛ با توالی 5'-atcggatccCTAGGCTACATACACGCGAAA-3' استفاده شد. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۵۰ µl حاوی (pH ۸/۸) ۲۰ mM Tris-HCl، ۱۰ mM $(NH_4)_2SO_4$، ۱۰ mM KCl، ۲ mM $MgSO_4$، ۰/۱ درصد Triton X-100، ۰/۱ mg/ml BSA، ۰/۱ µM از هر dNTP، ۵۰ pM از هر آغازگر (رفت و برگشت)، ۱۰۰ ng DNA الگو و ۱/۲۵ واحد از آنزیم *Pfu* DNA polymerase مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR با استفاده از یک دستگاه ترموسایکلر قابل برنامه‌ریزی (Techne-TC512، انگلستان) در ۳۵ چرخه دمایی انجام شد که شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد و به مدت یک دقیقه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت یک تا دو دقیقه بود. همچنین مرحله واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت سه دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ده دقیقه انجام گرفت.

همسانه سازی و توالی‌یابی DNA

پس از خالص‌سازی محصولات PCR با اندازه مورد نظر از روی ژل با استفاده از کیت استخراج اسید نوکلئیک (GF-1 PCR Clean Up Kit-Vivantis)، قطعات مورد نظر و ناقل پلاسمیدی pUC19 توسط آنزیم برشی *Bam*HI هضم گردیده و واکنش اتصال با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 انجام گرفته و محلول‌های اتصال به طور جداگانه و به روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد

Archive of SID
www.SID.ir

باکتری اشریشیاکلی (*Escherichia coli*) سویه DH5α، انتقال داده شدند (Sambrook and Russell 2001). پس از انجام آزمون سفید- آبی، پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از روش تحلیل قلیایی با SDS استخراج گردیده و با استفاده از کیت GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) خالص‌سازی شدند. توالی یابی DNA پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از آغازگرهای راه-انداز باکتریوفاژ T7 در دو جهت رفت و برگشت و با روش توالی‌یابی Dideoxynucleotide توسط شرکت Seqlab (Sequence Laboratories Gottingen-Germany) انجام شد.

بررسی توالی و مطالعات فیلوژنتیکی

بررسی و تعیین موقعیت توالی‌های اینترون و اگزون ژن همسانه-سازی شده با استفاده از برنامه BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی امریکا (NCBI) انجام گرفته و توالی نوکلئوتیدی حاصل از توالی‌یابی با استفاده از برنامه Translate (http://www.expasy.ch/tools) مورد ترجمه قرار گرفت. همچنین تهیه همردیف‌سازی‌های چندگانه و ساخت درخت فیلوژنتیکی با استفاده از انواع تیوردوکسین‌های موجودات مختلف به کمک نرم‌افزار ClustalW (http://ClustalW.genome.ad.jp) انجام شد. شماره دستیابی توالی‌های پروتئینی موجود در NCBI GenBank که برای ساخت همردیف‌سازی‌های چندگانه و درخت فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند در جدول ۱ آورده شده است.

نتایج و بحث

مطالعه فیلوژنتیکی ژن‌های تیوردوکسین از موجودات مختلف مطالعه فیلوژنتیکی توالی اسیدآمینه‌ای تیوردوکسین‌ها از موجودات مختلف، موجود در پایگاه اطلاعات توالی NCBI GenBank، با استفاده از نرم‌افزار ClustalW به روش اتصال همسایه (Neighbor joining) منجر به ساخت یک درخت فیلوژنتیکی با گروه‌های مختلف گردید (شکل ۱). درخت فیلوژنتیکی به دو شاخه اصلی شامل تیوردوکسین‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی تقسیم‌بندی می-شود. شاخه پروکاریوتی از تیوردوکسین‌های باکتریایی و تیوردوکسین‌های *m*، *p*، *s*، *x* و *y* گیاهان عالی تشکیل شده است. تیوردوکسین‌های *m*، *x* و *y* در هسته کد شده و درون کلروپلاست‌ها قرار گرفته و دارای یک انتهای آمینو با طول زیاد می‌باشند که احتمالاً به عنوان یک پپتید انتقالی برای ورود به درون کلروپلاست‌ها عمل می‌نماید (Lemaire et al. 2007). تیوردوکسین‌های *p* و *s* که به تازگی در گیاهان آرابیدوپسیس و یونجه (*Medicago truncatula*) شناسایی شده‌اند نیز در شاخه تیوردوکسین‌های پروکاریوتی قرار گرفته و همراه با تیوردوکسین-های *m*، *x* و *y* دارای منشأ پروکاریوتی می‌باشند (Alkhalfioui et al. 2008; Arsova et al. 2010). تیوردوکسین *p* با موقعیت کلروپلاستی و مشارکت در بیان ژن‌های پلاستیدی، نسبت به تیوردوکسین‌های *m*، *s*، *x* و *y* در فاصله دورتری قرار گرفته و گروه مجزایی را تشکیل می‌دهد (Arsova et al. 2010; Meng et al. 2010)، در حالی که تیوردوکسین *s* در مجاورت تیوردوکسین *m* قرار گرفته و احتمالاً پس از تفکیک گیاهان عالی از یکدیگر، از این گروه (تیوردوکسین *m*) تکامل یافته و محل فعالیتش درون شبکه آندوپلاسمی است (Alkhalfioui et al. 2008). تیوردوکسین‌های باکتریایی نیز یک گروه مجزا را درون تیوردوکسین *m* گیاهان عالی تشکیل می‌دهند که نشان دهنده شباهت بالای توالی پروتئینی بین آن‌ها و به احتمال قوی تکامل تیوردوکسین *m* از تیوردوکسین‌های باکتریایی می‌باشد (Sahrawy et al. 1996).

شاخه یوکاریوتی به تیوردوکسین‌های مهره‌داران، قارچ‌ها، جلبک سبز کلامیدوموناس (*Chlamydomonas reinhardtii*) و تیوردوکسین‌های *f*، *h* و *o* گیاهان عالی تقسیم‌بندی می‌شود. تیوردوکسین *f* درون کلروپلاست‌ها قرار داشته (Lemaire et al. 2007) و یک گروه مجزایی را نزدیک مهره‌داران تشکیل می‌دهد. نکته جالب توجه آن است که اگر چه تیوردوکسین‌های *f*، *m*، *p*، *x* و *y* از نظر موقعیت زیرسلولی مشابه بوده و همگی درون کلروپلاست قرار دارند، اما به نظر می‌رسد که نحوه تکامل ژنتیکی تیوردوکسین *f* با سایر تیوردوکسین‌های کلروپلاستی متفاوت بوده و از یک تیوردوکسین یوکاریوتی مشتق شده است (Sahrawy et al. 1996). تیوردوکسین *o* با داشتن یک پپتید انتقالی و موقعیت زیرسلولی میتوکندریایی (Laloi et al. 2001) از نظر تکاملی به

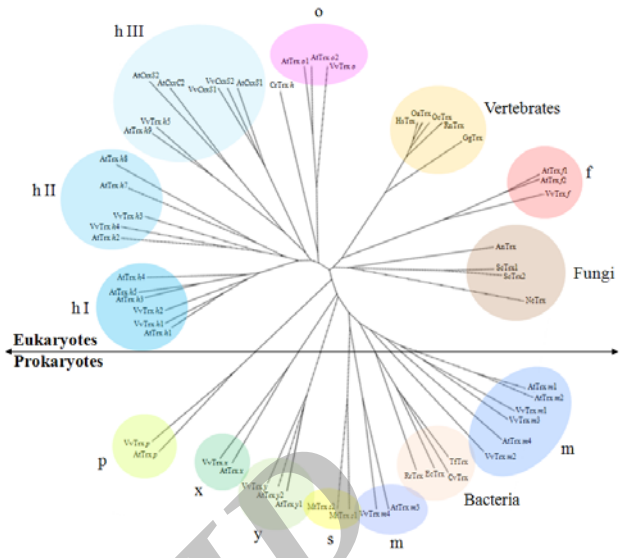
Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- شماره دستیابی توالی‌های پروتئینی موجود در NCBI GenBank مورد استفاده برای ساخت همردیف‌سازی‌های چندگانه و درخت فیلوژنتیکی

ردیف	نام موجود زنده		اسم علمی	نام ژن	شماره دستیابی
۱	مهره‌داران	انسان	*Homo sapiens*	HsTrx	X70286, X70287, X70288
		موش صحرایی	*Rattus norvegicus*	RnTrx	P11232
		خرگوش	*Oryctolagus cuniculus*	OcTrx	P08628
		مرغ	*Gallus gallus*	GgTrx	P08629
		گوسفند	*Ovis aries*	OaTrx	P50413
۲	گیاهان عالی	ارابیدوپسیس	*Arabidopsis thaliana*	AtTrx *h*1	U35827
				AtTrx *h*2	U35826
				AtTrx *h*3	U35640
				AtTrx *h*4	U35828
				AtTrx *h*5	U35829
				AtTrx *h*7	AC007258
				AtTrx *h*8	AC010675
				AtTrx *h*9	AC012562
				At*Cxx*S1	At1g11530
				At*Cxx*S2	U35639
				At*Cxx*C2	At3g56420
				AtTrx *o*1	AC004238
				AtTrx *o*2	At1g31020
				AtTrx *m*1	At1g03680
				AtTrx *m*2	AL161497
				AtTrx *m*3	AC006248
				AtTrx *m*4	At3g15360
				AtTrx *f*1	AC018363
				AtTrx *f*2	At5g16400
				AtTrx *x*	AC007980
				AtTrx *y*1	At1g76760
				AtTrx *y*2	At1g43560
				AtTrx *p*	AC023912
		انگور	*Vitis vinifera*	VvTrx *h*1	NC_012010
				VvTrx *h*2	NC_012024
				VvTrx *h*3	NC_012007
				VvTrx *h*4	NC_012020
				VvTrx *h*5	NC_012014
				Vv*Cxx*S1	EU280166
				VvTrx *o*	NW_002239150
				VvTrx *m*1	NC_012018
				VvTrx *m*2	NC_012024
				VvTrx *m*3	NC_012025
				VvTrx *m*4	NC_012009
				VvTrx *f*	NC_012010.2
				VvTrx *x*	NW_002239280
				VvTrx *y*	NW_002238144
				VvTrx *p*	NW_002239885
		یونجه	*Medicago truncatula*	MtTrx *s*1	DQ121444
				MtTrx *s*2	DQ121445
۳	جلبک‌ها	جلبک سبز	*Chlamydomonas reinhardtii*	CrTrx *h*	P80028
۴	قارچ‌ها	مخمر	*Saccharomyces cerevisiae*	ScTrx1	M59168
				ScTrx2	M59169
		نئوروسپورا	*Neurospora crassa*	NcTrx	D45892
		اسپرژیلوس	*Aspergillus nidulans*	AnTrx	XM-652682
۵	باکتری‌ها	اشریشیاکلی	*Escherichia coli*	EcTrx	P0AA27
		کروماتیوم	*Chromatium vinosum*	CvTrx	P09857
		رودواسپیریلیوم	*Rhodospirillum rubrum*	RrTrx	P10473
		تیوباسیلوس	*Thiobacillus ferrooxidans*	TfTrx	U20361

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی تیوردوکسین‌ها از موجودات مختلف. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از توالی اسیدآمینه‌ای تیوردوکسین‌ها از موجودات مختلف، موجود در پایگاه اطلاعات توالی NCBI GenBank و توسط نرم‌افزار ClustalW به روش اتصال همسایه (Neighbor joining) ساخته شد.

گروه تیوردوکسین‌های *h* و جلبک کلامیدوموناس نزدیک می‌باشد. گروه تیوردوکسین‌های *h* در مقایسه با سایر تیوردوکسین های شناسایی شده دارای اشکال متنوع و چندگانه‌ای بوده که بطور وسیع در گیاهان عالی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Gelhaye et al. 2004). تیوردوکسین‌های *h* درون سیتوزول، میتوکندری، شبکه آندوپلاسمی، غشاء پلاسمایی و حتی هسته سلول قرار داشته و بر اساس بررسی توالی اولیه پروتئینی و موقعیت زیرسلولی به سه زیرگروه مختلف I، II و III تقسیم‌بندی می‌شود (Gelhaye et al. 2005). تیوردوکسین‌های مهره‌داران نیز از نظر تکاملی بسیار به یکدیگر نزدیک می‌باشند که این نشان دهنده شباهت زیاد بین توالی‌های پروتئینی و وقوع تکامل با سرعت اندک در تیوردوکسین‌های یوکاریوت‌های عالی است، در حالی که تیوردوکسین‌های یوکاریوت‌های پست از قبیل قارچ‌ها و جلبک کلامیدوموناس (به عنوان یک جد شناخته شده برای تیوردوکسین‌های گیاهان عالی به ویژه *h* و *o*) از نظر تکاملی بسیار با یکدیگر متفاوتند (Sahrawy et al. 1996).

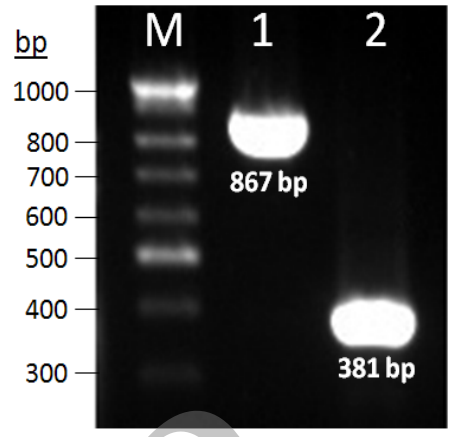
نتایج بدست آمده از بررسی فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که تیوردوکسین‌ها به فراوانی در تمام موجودات زنده از پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت‌های عالی وجود داشته اما تنوع و گستردگی آن‌ها در گیاهان عالی قابل مقایسه با پروکاریوت‌ها و سایر یوکاریوت‌ها، به ویژه مهره‌داران نیست. به عبارت دیگر، اگر چه تیوردوکسین‌ها به احتمال زیاد از یک جد مشترک بوجود آمده‌اند، اما دستخوش یک تکامل سریع درون یوکاریوت‌ها قرار گرفته به نحوی که موقعیت‌ها و توالی‌های اینترون درون ژن‌های تیوردوکسین می‌تواند به عنوان نشانه‌هایی از تکامل مورد توجه قرار گیرند (Sahrawy et al. 1996). به هر حال، این نتایج با فرضیه پروکاریوتی بودن تیوردوکسین‌های *m*، *x* و *y* و یوکاریوتی بودن تیوردوکسین‌های *f*، *h* و *o* گیاهان عالی مطابقت داشته و نشان می‌دهد که به احتمال زیاد تیوردوکسین‌های *p* و s نیز دارای منشا پروکاریوتی می‌باشند.

موقعیت اینترون‌ها در توالی ژنومی تیوردوکسین‌های *h* انگور و سایر گیاهان عالی

توالی‌های DNA ژنومی و ORF ژن VvCxxS2 با استفاده از آغازگرهای ویژه VvCxxSF و VvCxxSR، طراحی شده بر اساس توالی EST شناسایی شده در پایگاه اطلاعات توالی NCBI GenBank، همسانه‌سازی و توالی‌یابی گردیدند. قطعات DNA ژنومی و چارچوب باز خواندنی ژن VvCxxS2 به ترتیب ۸۶۷ bp و ۳۸۱ bp طول داشته و یک پروتئین با ۱۲۶ اسیدآمینه را کد می‌نماید (شکل ۲). بررسی با برنامه BLAST نشان داد که توالی ژنومی VvCxxS2، ثبت شده در پایگاه اطلاعات توالی NCBI GenBank تحت شماره دستیابی HM370528، حاوی سه توالی اگزون (به ترتیب با اندازه‌های ۱۰۷ bp، ۱۲۲ bp و ۱۵۲ bp) و دو توالی اینترون (به ترتیب با طول‌های ۲۷۱ bp و ۲۱۴ bp) می‌باشد (شکل ۳). اتصالات اگزون- اینترون در ژن VvCxxS2 همانند ژن‌های گیاهان عالی از قانون GT-AG تبعیت نموده (Gallie 1993) و توالی‌های اینترون در مقایسه با توالی‌های کد کننده اگزون از نظر AT نسبتا غنی می‌باشند.

به منظور مقایسه راحت‌تر، جایگاه اتصال بین توالی‌های اگزون و اینترون در توالی‌های پروتئینی بوسیله اسیدآمینه شماره‌گذاری شده بر اساس موقعیت اسیدآمینه مشابه در توالی پروتئینی تیوردوکسین باکتری اشریشیاکلی (*E. coli*) نشان داده می‌شود. به

Archive of SID
www.SID.ir

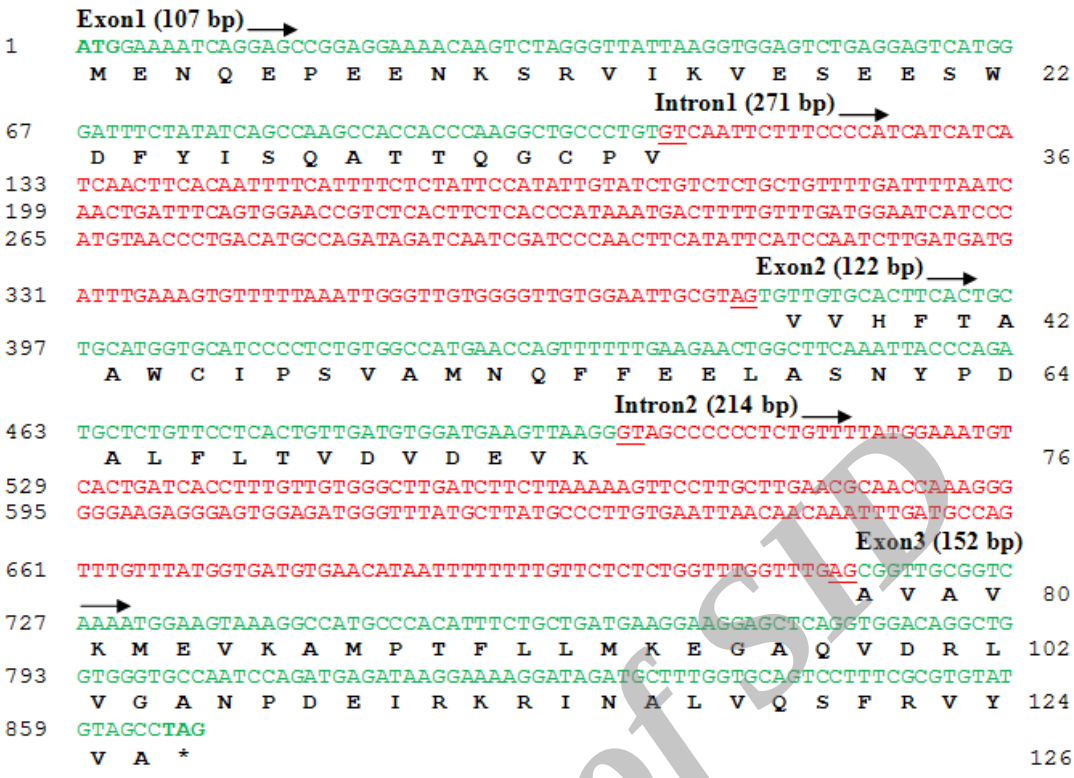


شکل ۲- نتایج PCR و RT-PCR ژن *VvCxxS2* و الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد. M) نشانگر مولکولی bp 100، ۱) PCR قطعه DNA ژنومی ژن Vv*CxxS2* به طول bp ۸۶۷ و ۲) RT-PCR قطعه ORF ژن Vv*CxxS2* به طول bp ۳۸۱.

عبارت دیگر عدد صفر نشان دهنده جایگاه اتصال بین اسیدآمینه نشان داده شده و اسیدآمینه قبلی بوده و اعداد یک و دو نشان می‌دهند که جایگاه اتصال درون اسیدآمینه مورد نظر می‌باشد با این تفاوت که عدد یک مربوط به جایگاه اتصال بین اولین و دومین نوکلئوتید و عدد دو نشان دهنده جایگاه اتصال بین دومین و سومین نوکلئوتید است. بررسی ساختار ژن‌های تیوردوکسین در موجودات مختلف نشان می‌دهد که برخلاف پروکاریوت‌ها و قارچ‌ها، این ژن‌ها در مهره‌داران، گیاهان عالی و جلبک‌ها حاوی اینترون‌هایی با اندازه‌های متفاوت می‌باشند (شکل ۴الف). توالی ژنومی Vv*CxxS2* همراه با سایر ژن‌های تیوردوکسین *h* انگور (Jaillon et al. 2007) دارای اینترون‌هایی در مکان‌های مشابه می‌باشند. این توالی‌های ژنومی وجود دو اینترون را در ژن‌های VvTrx *h1* [(صفر) ۲۴I؛ (صفر) ۶۶S]، VvTrx *h2* [(صفر) ۲۴V؛ (صفر) ۶۶T]، VvTrx *h3* [(صفر) ۲۴M؛ (صفر) ۶۶D]، VvTrx *h4* [(صفر) ۲۴M؛ (صفر) ۶۶D]، Vv*CxxS1* [(صفر) ۲۴V؛ (صفر) ۶۶E] و Vv*CxxS2* [(دو) ۲۴V؛ (یک) ۶۶A] نشان می‌دهند (شکل ۴ب). در ژن Vv*CxxS2*، اسیدهای آمینه والین (Val) و آلانین (Ala) به ترتیب در موقعیت های ۳۶ و ۷۷ قرار گرفته و جایگاه‌های اتصال بین دومین و سومین نوکلئوتید برای اسیدآمینه والین [(GT/T)V۲۴] و اولین و دومین نوکلئوتید برای اسیدآمینه آلانین [(G/CG)A۶۶] واقع هستند. بررسی توالی ژنومی تیوردوکسین‌های *h* سایر گیاهان عالی نشان داد که ژن‌های AtTrx *h1* [(صفر) ۲۴V؛ (صفر) ۶۶S]، AtTrx *h2* [(صفر) ۲۴L؛ (صفر) ۶۶D]، AtTrx *h5* [(صفر) ۲۴I] (۲۳)، AtTrx *h9* [(صفر) ۱۳G–؛ (صفر) ۲۴V؛ (صفر) ۶۶D]، At*CxxS1* [(صفر) ۲۴I؛ (صفر) ۶۶E] از آرابیدوپسیس، ژن NtTrx *h2* [(صفر) ۲۴I؛ (صفر) ۶۶S] از تنباکو (*Nicotiana tabacum*) (Brugidou et al. 1993) و ژن OsTrx *h1* [(صفر) ۲۴V؛ (صفر) ۶۶E] از برنج (*Oryza sativa*) (Ishiwatari et al. 1995) نیز حاوی اینترون‌هایی در مکان‌های مشابه با ژن‌های تیوردوکسین *h* انگور می‌باشند (شکل ۴ب). بنابراین نتایج نشان دهنده موقعیت حفظ شده دو توالی اینترون در ژن‌های تیوردوکسین *h* گیاهان عالی می‌باشد (Meyer et al. 2002).

برخلاف سایر ژن‌های تیوردوکسین *h* گیاهان عالی با دو توالی اینترون، ژن‌های AtTrx *h5* و AtTrx *h9* وضعیت متفاوتی از نظر تعداد اینترون‌ها نشان می‌دهند که بیانگر تکامل سریع در این ژن هاست. در ژن AtTrx *h5* که تنها حاوی یک اینترون مطابق با اولین اینترون ژن‌های تیوردوکسین‌های *h* است، اینترون دوم خود را طی یک واکنش حذف‌شدگی در طی تکامل از دست داده است (Sahrawy et al. 1996)، در حالی که در ژن AtTrx *h9* شرایط بالعکس می‌باشد. اکثر نتایج بدست آمده موقعیت حفظ شده و اندازه متفاوت دو اینترون را در ژن‌های تیوردوکسین *h* گیاهان عالی نشان می‌دهد. در انگور، ژن‌های VvTrx *h1* و VvTrx *h2* نسبت به سایر تیوردوکسین‌های *h* انگور، اینترون‌های خیلی بزرگتری دارند. همچنین برخلاف ژن Vv*CxxS1*، توالی اینترون یک نسبت به اینترون دو در ژن‌های VvTrx *h1*، VvTrx *h2* و Vv*CxxS2* بزرگتر می‌باشد، در حالی که اندازه اینترون‌ها در ژن های VvTrx *h3* و VvTrx *h4* تقریبا یکسان است (شکل ۴الف). اندازه اینترون‌ها به نوع گونه گیاهی بستگی دارد (Sahrawy et al. 1996)؛ به عنوان مثال اندازه اینترون‌ها در ژن‌های تیوردوکسین *h* آرابیدوپسیس در مقایسه با انگور (*VvTrx h1* و *VvTrx h2*)، تنباکو (NtTrx *h2*) و برنج (OsTrx *h1*) خیلی کوتاهتر می‌باشد. ژن‌های *VvTrx h1*، *VvTrx h2* و *VvCxxS2* انگور با ژن‌های *AtTrx h1*، *AtCxxS1*، *NtTrx h2* و *OsTrx h1* در اینکه اینترون یک آن‌ها بزرگتر از اینترون دو است، مشابه هستند (شکل ۴الف)

Archive of SID
www.SID.ir

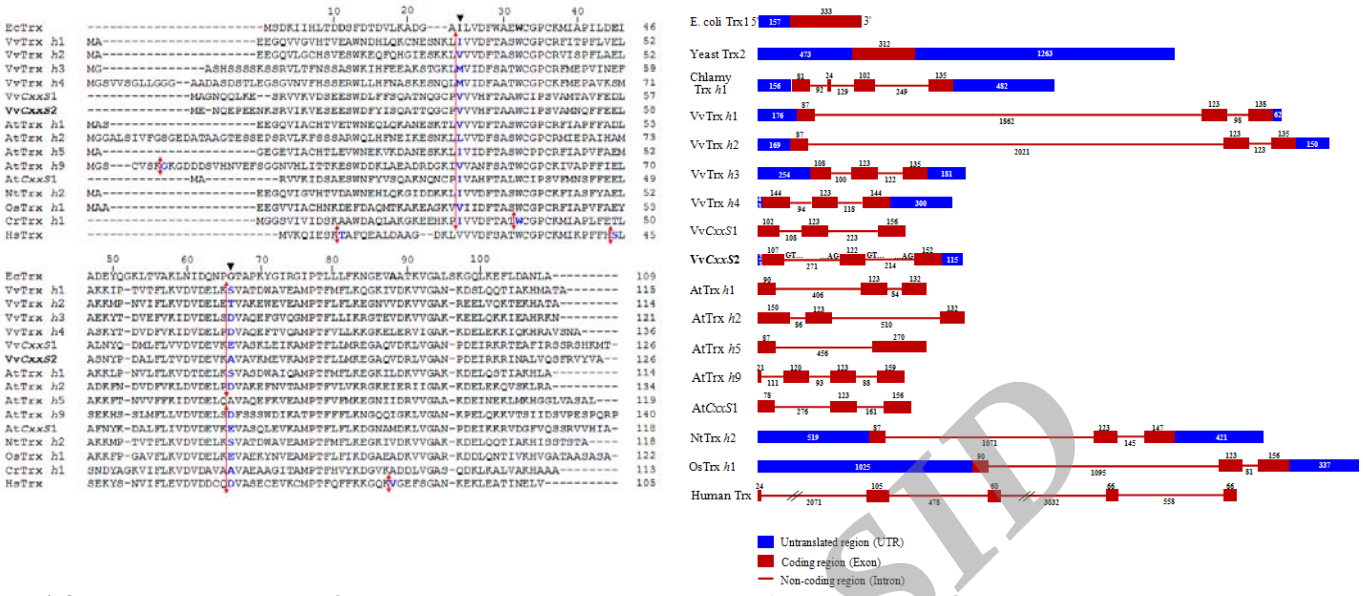


شکل ۳- توالی‌های نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای ژن VvCxxS2. ژن VvCxxS2 حاوی سه توالی اگزون (با اندازه‌های ۱۰۷ bp، ۱۲۲ bp و ۱۵۲ bp) و دو توالی اینترون (با طول‌های ۲۷۱ bp و ۲۱۴ bp) می‌باشد که به ترتیب با رنگ‌های سبز و قرمز مشخص شده‌اند. اتصالات اگزون- اینترون () به صورت و شماره‌های نوکلئوتیدها و اسیدهای آمینه به ترتیب در سمت چپ و راست نشان داده شده‌اند.

که نشان دهنده یک کاهش یا افزایش هماهنگ شده در توالی نوکلئوتیدی اینترون‌ها در طی تکامل می‌باشد (Sahrawy et al. 1996). بررسی توالی اینترون‌ها با استفاده از برنامه BLAST، هیچ گونه شباهتی را بین توالی‌های اینترون از ژن‌های تیوردوکسین *h* متفاوت و توالی‌های نزدیک از یک گونه گیاهی نشان نداد که می تواند تأیید کننده این فرضیه باشد که توالی‌های اینترونی سریعتر از توالی‌های کد کننده (اگزون‌ها) تکامل می‌یابند (Koonin 2006). موقعیت اینترون‌ها در ژن‌های تیوردوکسین از باکتری اشریشیاکلی، مخمر ساکارومیسس (*Saccharomyces cerevisiae*)، جلبک سبز کلامیدوموناس (*C. reinhardtii*) و انسان (*Homo sapiens*) نیز مورد بررسی قرار گرفت. ژن‌های تیوردوکسین از باکتری اشریشیاکلی و مخمر ساکارومیسس فاقد اینترون بوده در حالی که ژن‌های تیوردوکسین از جلبک کلامیدوموناس و انسان به ترتیب حاوی سه و چهار توالی اینترون می‌باشند (شکل ۴الف). در ژن *h* CrTrx از جلبک کلامیدوموناس [(صفر) ۲۴I؛ (صفر) ۳۲W؛ (صفر) ۶۶A] اولین و سومین اینترون با دو اینترون ژن VvCxxS2 و ژن‌های تیوردوکسین *h* گیاهان عالی مطابقت داشته در حالی که دومین اینترون درون توالی اگزون دو قبل از جایگاه فعال قرار گرفته است (شکل ۴ب). همچنین در انسان و سایر مهره‌داران، ژن‌های تیوردوکسین دارای ۴ توالی اینترون در موقعیت‌های مشابه [(صفر) ۱۱T؛ (صفر) ۴۵S؛ (صفر) ۶۶D؛ (صفر) ۸۸V] بوده، به طوری که اینترون سه آن‌ها در موقعیت مشابه با اینترون دو تیوردوکسین‌های *h* گیاهان عالی قرار گرفته است (شکل ۴ب). این نتایج نشان می‌دهد که ژن‌های تیوردوکسین از جلبک کلامیدوموناس و مهره‌داران به همراه تیوردوکسین‌های *h* گیاهان عالی، اگر چه دارای تفاوت‌هایی در توالی اسیدآمینه‌ای خود می-باشند، اما همگی آن‌ها به احتمال زیاد دارای یک جد مشترک با حداقل یک توالی اینترون در موقعیت ۶۶ می‌باشند.

Archive of SID
www.SID.ir

الف ب

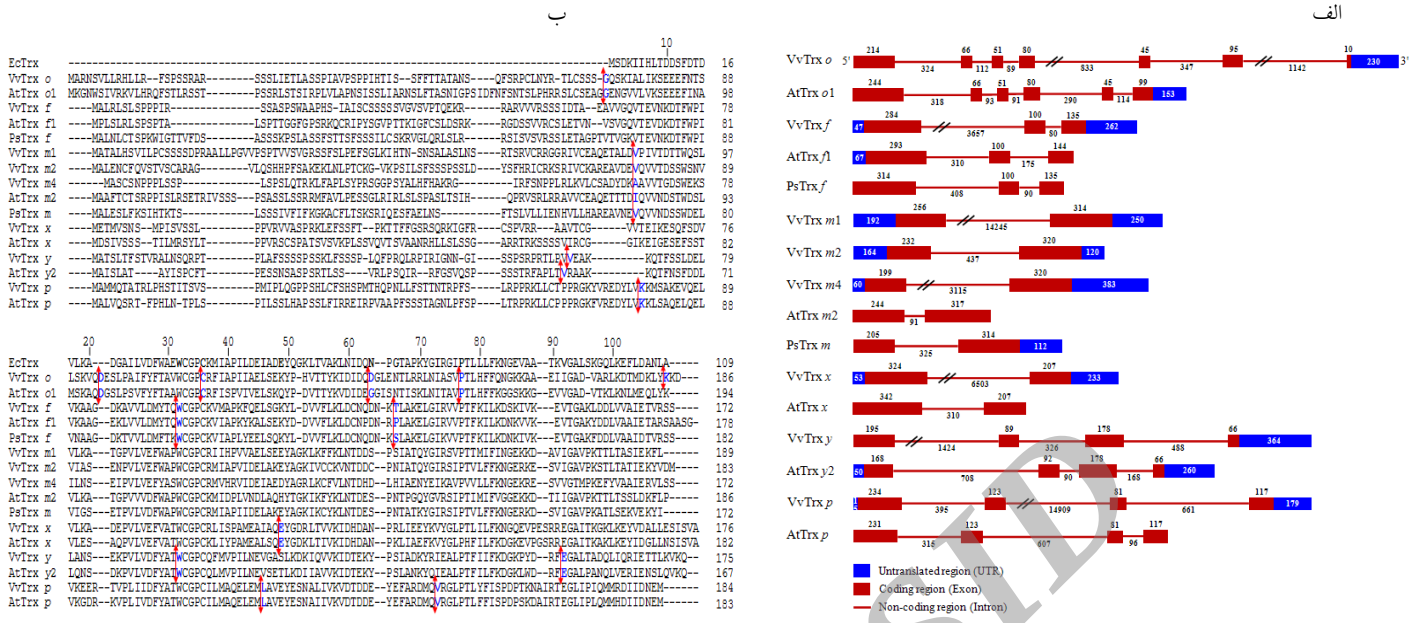


شکل ۴- ساختار و موقعیت اینترون‌های ژن VvCxxS2 و سایر ژن‌های تیوردوکسین از موجودات مختلف. الف) ساختار ژن VvCxxS2، ژن‌های تیوردوکسین *h* انگور و ژن‌های تیوردوکسین از انسان، گیاهان عالی، جلبک کلامیدوموناس، مخمر ساکارومیسس و باکتری اشریشیاکلی. نواحی غیرقابل ترجمه (UTR)، رمزگردان (Exon) و غیر رمزگردان (Intron) با ذکر اندازه، به ترتیب با نوارهای آبی، قرمز و خطوط قرمز رنگ نشان داده شده‌اند. ب) موقعیت اینترون‌ها در ژن VvCxxS2، ژن‌های تیوردوکسین *h* انگور و ژن‌های تیوردوکسین از انسان، گیاهان عالی، جلبک کلامیدوموناس و باکتری اشریشیاکلی. توالی‌های پروتئینی بدست آمده از تیوردوکسین‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalW همردیف شده و موقعیت اینترون‌ها با علامت فلش مشخص شده‌اند. از توالی پروتئینی تیوردوکسین باکتری اشریشیاکلی برای شماره-گذاری استفاده گردیده و اسیدآمینه آغاز کننده توالی اینترون‌ها نیز با رنگ آبی و علامت مثلث نشان داده شده است. شماره دستیابی ژن‌های OsTrx *h*1 از برنج (*Oryza sativa*) و NtTrx *h*2 از توتون (*Nicotiana tabacum*) به ترتیب عبارتند از: D26547 و Z11803.

موقعیت اینترون‌ها در توالی ژنومی تیوردوکسین‌های انگور و سایر گیاهان

بررسی ساختار ژن‌های تیوردوکسین‌های *f*، *m*، *o*، *p*، *x* و *y* در انگور و گیاهانی از قبیل آرابیدوپسیس و نخود فرنگی (*P. sativum*) نشان داد که این ژن‌ها همانند ژن‌های تیوردوکسین *h* حاوی اینترون‌هایی در موقعیت‌های متفاوت با اندازه‌های مختلف می‌باشند (شکل ۵الف). ژن‌های *f* VvTrx [(دو) ۳۲W؛ (صفر) ۶۶T] انگور، *f*1 AtTrx [(دو) ۳۲W؛ (صفر) ۶۶P] آرابیدوپسیس و PsTrx *f* [(دو) ۳۲W؛ (صفر) ۶۶S] از نخود فرنگی حاوی دو اینترون در مکان‌های مشابه ۳۲ و ۶۶ می‌باشند (شکل ۵ب). اولین اینترون قبل از اسیدآمینه تریپتوفان جایگاه فعال (W۳۲)، مشابه با اینترون دوم تیوردوکسین *h* کلامیدوموناس قرار گرفته و موقعیت اینترون دوم مطابق با دومین اینترون ژن‌های تیوردوکسین *h* گیاهان عالی است که نظریه یوکاریوتی بودن تیوردوکسین *f* را قویا تایید می-کند (Hartman et al. 1990). در ژن‌های تیوردوکسین *f* مورد بررسی، توالی اینترون یک بزرگتر از اینترون دو بوده و ژن VvTrx *f* در مقایسه با دو ژن دیگر دارای بزرگترین توالی اینترون یک می‌باشد (شکل ۵الف). ژن‌های VvTrx *o* [(یک) ۰G؛ (یک) D–؛ (یک) ۳۶C؛ (صفر) ۶۴D؛ (صفر) ۷۷P؛ (۲) ۱۰۹K] انگور و AtTrx *o*1 [(یک) ۰G؛ (یک) D–؛ (یک) ۳۶C؛ (صفر) ۶۴G؛ (صفر) ۷۷P] از آرابیدوپسیس به ترتیب دارای ۶ و ۵ اینترون در مکان‌های مشابه می‌باشند (شکل ۵ب). همان طور که مطالعات فیلوژنتیکی نشان داد، تیوردوکسین *o* همانند تیوردوکسین‌های *f* و *h* دارای منشا یوکاریوتی می‌باشند (شکل ۱). به هر حال در تیوردوکسین *o*، توالی‌های اینترون با موقعیت مشابه با تیوردوکسین‌های *f* و *h* مشاهده نشده و به نظر می‌رسد که اینترون‌های تیوردوکسین *o* در طی یک تکامل دیرهنگام به توالی ژنومی اضافه شده‌اند (Sahrawy et al. 1996). ژن‌های

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۵- ساختار و موقعیت اینترون‌های ژن‌های تیوردوکسین‌های *f*، *m*، *o*، *p*، *x* و *y* گیاهان عالی. الف) ساختار ژن‌های تیوردوکسین‌های *f*، *m*، *o*، *p*، *x* و *y* در گیاهان آرابیدوپسیس، انگور و نخود فرنگی. نواحی غیرقابل ترجمه (UTR)، رمزگردان (Exon) و غیر رمزگردان (Intron) با ذکر اندازه، به ترتیب با نوارهای آبی، قرمز و خطوط قرمز رنگ نشان داده شده‌اند. ب) موقعیت اینترون‌ها در ژن‌های تیوردوکسین‌های *f*، *m*، *o*، *p*، *x* و *y* در گیاهان آرابیدوپسیس، انگور و نخود فرنگی. توالی‌های پروتئینی بدست آمده از تیوردوکسین‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalW همردیف شده و موقعیت اینترون‌ها با علامت فلش مشخص شده‌اند. از توالی پروتئینی تیوردوکسین باکتری اشریشیاکلی برای شماره‌گذاری استفاده گردیده و اسیدآمینه آغاز کننده توالی اینترون‌ها نیز با رنگ آبی نشان داده شده است.

تیوردوکسین *m* از انگور: VvTrx *m*1 [(یک) ۵V]، VvTrx *m*2 [(یک) ۵V]، VvTrx *m*4 [(یک) ۵A]، آرابیدوپسیس: AtTrx *m*2 [(یک) ۵I] و نخود فرنگی: PsTrx *m* [(یک) ۵V] تنها حاوی یک اینترون در موقعیت مشابه می‌باشند که بین توالی پپتید انتقالی و پروتئین بالغ قرار می‌گیرد (Jaillon et al. 2007) (شکل ۵ب). در مقایسه با گیاهان آرابیدوپسیس و نخود فرنگی، ژن‌های تیوردوکسین *m* از انگور حاوی اینترون‌هایی با اندازه بزرگتر بوده و همان طور که گفته شد، اندازه اینترون‌ها به نوع گونه گیاهی بستگی دارد (شکل ۵الف). موقعیت اینترون در ژن‌های تیوردوکسین *m* با موقعیت اینترون‌ها در تیوردوکسین‌های *f* و *h* مشابه نبوده و این نشان دهنده اضافه شدن تازه توالی اینترون در طول تکامل دیرهنگام در توالی ژنومی تیوردوکسین *m* می‌باشد که تایید کننده منشا پروکاریوتی آن‌هاست (Sahrawy et al. 1996). این وضعیت در ژن‌های تیوردوکسین *x* نیز مشاهده می‌شود با این تفاوت که توالی اینترون مابین پپتید انتقالی و پروتئین بالغ واقع نشده و پس از جایگاه فعال پروتئین قرار می‌گیرد.

تیوردوکسین *x* همانند تیوردوکسین *m*، تنها دارای یک اینترون می‌باشد که طول آن در گونه‌های مختلف گیاهی متفاوت است. این توالی اینترون در موقعیت مشابه در ژن‌های تیوردوکسین *x* قرار دارد: VvTrx *x* [(صفر) ۴۹E]، AtTrx *x* [(صفر) ۴۹E] (شکل ۵ب). بررسی ژن‌های تیوردوکسین‌های *p* و *y* از انگور و آرابیدوپسیس نیز نشان داد که هر یک از آن‌ها حاوی سه اینترون در موقعیت‌های مشابه بوده به طوری که توالی اینترون یک در ژن های تیوردوکسین *y* و توالی اینترون دو در ژن‌های تیوردوکسین *p* نسبت به اینترون‌های دیگر بزرگتر می‌باشند (شکل ۵الف). در ژن‌های VvTrx *y* [(صفر) ۷V–؛ (۲) ۳۲W؛ (صفر) ۹۲E] و AtTrx *y*2 [(صفر) ۷V–؛ (۲) ۳۲W؛ (صفر) ۹۲E] اولین اینترون مابین توالی پپتید انتقالی و پروتئین بالغ قرار گرفته و موقعیت اینترون دوم مشابه با اولین اینترون تیوردوکسین *f* و دومین اینترون ژن CrTrx *h* می‌باشد (شکل ۵ب). همچنین در ژن‌های VvTrx *p* [(صفر) ۶K؛ (صفر) ۴۶L؛ (صفر) ۷۳V] و AtTrx *p* [(صفر) ۶K؛ (صفر) ۴۶L؛ (صفر) ۷۳V]، اینترون یک، توالی پپتید

Archive of SID

www.SID.ir

انتقالی را از توالی پروتئین بالغ جدا نموده و موقعیت سایر اینترون‌ها شباهتی با تیوردوکسین‌های بحث شده ندارد. به هر حال، موقعیت اینترون‌ها در تیوردوکسین‌های *p* و *y* با تیوردوکسین‌های *f*، *h* و *o* با منشا یوکاریوتی هیچ شباهتی نداشته و بنابراین چنین به نظر می‌رسد که احتمالاً این ژن‌ها دستخوش یک تکامل دیرهنگام شده و با توجه به نتایج بدست آمده از مطالعات فیلوژنتیکی، خاستگاه پروکاریوتی آن‌ها تأیید می‌شود (Meyer et al. 2002).

نتیجه‌گیری

امروزه نقش اینترون‌ها در تکامل و ارزش آن‌ها به عنوان نشانه-هایی از تکامل، موضوع بحث پژوهش‌های فراوانی است. با بررسی دقیق توالی اسیدآمینه‌ای و مقایسه موقعیت اینترون‌ها در ژن‌های تیوردوکسین از موجودات یوکاریوتی، تصویر جامعی از آغاز تکامل این ژن‌ها از یک جد مشترک با حداقل هفت اینترون بدست می‌آید. به هر حال، ژن‌های تیوردوکسین در یوکاریوت‌های عالی از قبیل جانوران و گیاهان عالی با کاهش در تعداد اینترون‌ها مواجه شده، به طوری که این کاهش در یوکاریوت‌های پست شامل قارچ‌ها و جلبک‌ها بیشتر می‌باشد.

در گیاهان عالی، ژن‌های تیوردوکسین، اینترون‌های زیادی را از دست داده و ژن‌هایی با سه اینترون، مشابه با ژن CrTrx *h* از کلامیدوموناس را بوجود آوردند که متعاقبا با ناپدید شدن یک اینترون دیگر به طور تصادفی، ژن‌هایی با دو اینترون (تیوردوکسین‌های *f* و *h*) تشکیل شدند. به عبارت دیگر، این احتمال وجود دارد که تیوردوکسین‌های *f* و *h* از ژن CrTrx *h* کلامیدوموناس تکامل یافته باشند. تکامل بیشتر در ژن‌های تیوردوکسین با منشا یوکاریوتی منجر به ایجاد یک ژن تیوردوکسین *h* با یک توالی اینترون منفرد (AtTrx *h*5) در آرابیدوپسیس گردید. برخلاف آنچه که گفته شد، ژن‌های تیوردوکسین *o* با منشا یوکاریوتی در طی تکامل با کاهش در تعداد اینترون‌ها مواجه نشده و به نظر می‌رسد که اینترون‌های خود را در طی یک تکامل دیرهنگام بدست آورده باشند، چرا که موقعیت اینترون‌های آن‌ها با جد مشترک یا حداقل با تیوردوکسین‌های *f* و *h* مشابه نبوده و احتمالا، برخلاف تیوردوکسین‌های یوکاریوتی، الگوی متفاوتی از تکامل را دارا می باشند که نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. ژن‌های تیوردوکسین های *m*، *p* و *y* دارای یک اینترون بین توالی پپتید انتقالی و پروتئین بالغ می‌باشند که در سایر ژن‌های هسته‌ای کد کننده پروتئین‌های کلروپلاستی نیز دیده می‌شود که نشان دهنده منشا پروکاریوتی این تیوردوکسین‌ها می‌باشد. به هر حال عدم وجود حتی یک توالی اینترون مشابه در ژن‌های تیوردوکسین‌های *m*، *p*، *x* و *y* نشان می‌دهد که احتمالا این اینترون‌ها در طی یک تکامل دیرهنگام به توالی ژن‌ها اضافه شده‌اند.

در مجموع، نتایج بدست آمده در این بررسی نشان می‌دهد که تیوردوکسین‌های *f*، *h* و *o* منشا یوکاریوتی و تیوردوکسین‌های *m*، *p*، *x* و *y* منشأ پروکاریوتی داشته و الگوی متفاوتی از تکامل را نشان می‌دهند. با این وجود همچنان نکات مبهم بیشماری باقی می‌ماند که نیاز به پژوهش‌های بیشتری دارد، از قبیل اینکه در طی تکامل تعداد اینترون‌ها در ژن‌های یوکاریوتی کاهش می‌یابد یا افزایش؟ آیا این کاهش یا افزایش تعداد اینترون‌ها یک امر تصادفی است یا یک فرآیند برنامه‌ریزی شده؟ به چه نحو تیوردوکسین‌های *f* و *o* با منشا یوکاریوتی به ترتیب می‌توانند در اندامک‌های کلروپلاست و میتوکندری فعالیت داشته باشند؟ نحوه تکامل تیوردوکسین *o* با منشا یوکاریوتی چگونه است؟ آیا همانند تیوردوکسین‌های *f* و *h* از کلامیدوموناس تکامل یافته‌اند یا خیر؟

منابع

(2007) Thioredoxin-linked proteins are reduced during germination of *Medicago truncatula* seeds. Plant Physiol 144:1559-1579

Arsova B, Hoja U, Wimmelbacher M, Greiner E, Ustun S, Melzer M, Petersen K, Lein W and Bornke F (2010) Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in

Alkhalfioui F, Renard M, Frendo P, Keichinger C, Meyer Y, Gelhaye E, Hirasawa M, Knaff DB, Ritzenthaler C and Montrichard F (2008) A novel type of thioredoxin dedicated to symbiosis in legumes. Plant Physiol 148:424-435

Alkhalfioui F, Renard M, Vensel WH, Wong J, Tanaka CK, Hurkman WJ, Buchanan BB and Montrichard F

Archive of SID
www.SID.ir

Arabidopsis and *Nicotiana benthamiana*. http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.110.220512

Brugidou C, Marty I, Chartier Y and Meyer Y (1993) The *Nicotiana tabacum* genome encodes two cytoplasmic thioredoxin genes which are differently expressed. Mol Gen Genet 238:285-293.

Gallie DR (1993) Post-transcriptional regulation of gene expression in plants. Ann Rev Plant Physiol 44:77-105

Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot JP (2003a) Evidence for a subgroup of thioredoxin *h* that requires GSH/Grx for its reduction FEBS Letters 555:443-448

Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot JP (2004) The thioredoxin *h* system of higher plants. Plant Physiol Biochem 42:265-271.

Gelhaye E, Rouhier N, Navrot N, Jacquot JP (2005) The plant thioredoxin system. CMLS Cell Mol Life Sci 62:24-35.

Gelhaye E, Rouhier N, Vlamis-Gardikas A, Girardet JM, Sautière PE, Sayzet M, Martin F, Jacquot JP (2003b) Identification and characterization of a third thioredoxin *h* in poplar. Plant Physiol Biochem 41:629-635

Hartman H, Syvanen M, Buchanan BB (1990) Contrasting evolutionary histories of chloroplast thioredoxins *f* and *m*. Mol Biol Evol 7:247-254.

Heidari Japelaghi R, Haddad R, Garoosi GA (2010) Expression analysis of three h-type thioredoxin isoforms in three Iranian grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars, indicating differential expression in different tissues. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding 1:26-33.

Heidari Japelaghi R, Haddad R, Garoosi GA (2011) Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. Mol Biotech 49:129-137.

Ishiwatari Y, Honda C, Kawashima I, Nakamura S, Hirano H, Mori S, Fujiwara T, Hayashi H and Chino M (1995) Thioredoxin *h* is one of the major proteins in rice phloem sap. Planta 195:456-463.

Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm. Nature 449:463-467.

Koonin EV (2006) The origin of introns and their role in eukaryogenesis: a compromise solution to the introns-early versus introns-late debate? Biol Direct 1:1-23.

Laloi C, Rayapuram N, Chartier Y, Grienenberger JM, Bonnard G, Meyer Y (2001) Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. Proc Natl Acad Sci USA 98:14144-14149.

Laloi C, Mestres OD, Marco Y, Meyer Y, Reichheld JP (2004) The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin *h5* gene induction by oxidative stress and its w-box-mediated response to pathogen elicitor Plant Physiol 134:1006-1016.

Lemaire SD, Michelet L, Zaffagnini M, Massot V and·Issakidis-Bourguet E (2007) Thioredoxins in chloroplasts. Curr Genet 51:343-365.

Maeda K, Hagglund P, Finnie C, Svensson B, Henriksen A (2008) Crystal structures of barley thioredoxin *h* isoforms *HvTrxh1* and *HvTrxh2* reveal features involved in protein recognition and possibly in discriminating the isoform specificity. Protein Science 17:1015-1024.

Meng L, Wong JH, Feldman LJ, Lemaux PG,Buchanan BB (2010) A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. PNAS 107:3900-3905

Meyer Y, Siala W, Bashandy T, Riondet C, Vignols F and Reichheld JP (2008) Glutaredoxins and thioredoxins in plants. Biochim Biophysic Acta 1783:589-600.

Meyer Y, Vignols F, Reichheld JP (2002) Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. Meth Enzymol. 347:394-402.

Sahrawy M, Hecht V, Jaramillo JL, Chueca A, Chartier Y, Meyer Y (1996) Intron position as an evolutionary marker of thioredoxins and thioredoxin domains. J Mol Evol. 42:422-431.

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual'. 3nd ed. Vol:1-3. Cold Spring Harbor Laboratory. Press Cold Spring Harbor New York USA

Archive of SID

www.SID.ir