

بررسی ایمنی و آلرژی‌زایی پروتئین **Deeper Rooting1** در برنج اصلاح‌شده ژنتیکی با رویکرد بیوانفورماتیکی

مطهره محسن پور^{۱*}، محدثه محسن پور^۲

۱. پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: تضمین پایداری تولید و افزایش بهره‌وری برنج (*اوریزا ساتیوا*) به عنوان یکی از مهم‌ترین غلات و غذای اصلی بخش بزرگی از جمعیت جهان از اهمیت بالایی برخوردار است. در این راستا، بهره‌گیری از فناوری‌های نوین نظیر اصلاحات مولکولی، مهندسی ژنتیک و به‌ویژه ویرایش ژنوم، به‌عنوان راهکارهایی مؤثر در بهبود عملکرد و افزایش مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی مورد توجه قرار گرفته‌اند. یکی از ژن‌های مورد استفاده در بهنژادی برنج، ژن **Deeper Rooting1 (DRO1)** است که نقش موثری در افزایش عمق ریشه، جذب بهتر آب و عناصر غذایی، به‌ویژه در شرایط تنش خشکی دارد. انتقال این ژن به ارقام دارای ریشه‌های کم‌عمق، موجب توسعه لاین‌هایی با ریشه‌های عمیق‌تر شده و در نتیجه، عملکرد گیاه در شرایط کم‌آبی به‌طور قابل‌توجهی بهبود می‌یابد. با توجه به لزوم ارزیابی ایمنی زیستی در گیاهان تراریخته، به‌ویژه در خصوص پتانسیل آلرژی‌زایی یا حساسیت‌زایی پروتئین‌های نوظهور، این مطالعه به بررسی ایمنی پروتئین **DRO1** اختصاص یافته است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، پس از تحلیل توالی کامل پروتئین **DRO1**، تعداد ۱۷۲ قطعه با طول ۸۰ اسیدآمین و ۲۴۴ پپتید ۸ اسیدآمین‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: هیچ‌یک با توالی‌های آلرژنی شناخته‌شده مطابقت نداشتند. همچنین، بررسی هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های گوارشی و تحلیل ساختار سه‌بعدی این پروتئین نیز عدم پتانسیل آلرژی‌زایی و حساسیت‌زایی را نشان دادند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، پروتئین **DRO1** را می‌توان به‌عنوان ترکیبی ایمن از منظر زیستی در نظر گرفت. بهره‌گیری از این ژن در برنامه‌های اصلاحی می‌تواند گامی مؤثر در جهت افزایش تحمل برنج به خشکی، کاهش مصرف آب، ارتقای بهره‌وری و در نهایت، دستیابی به امنیت غذایی و خودکفایی در تولید این محصول راهبردی باشد.

کلمات کلیدی: اثرات بالقوه آلرژی‌زایی و حساسیت‌زایی، برنج، **Deeper Rooting1**، امنیت غذایی

Evaluation of the properties and safety of Deeper Rooting 1 protein transferred to rice plant by investigating its allergenicity potential

Motahhareh Mohsenpour^{1*}, Mohaddeseh Mohsenpour²

1. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

2. Department of Microbiology, NT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: Ensuring the sustainability of production and enhancing the productivity of rice (*Oryza sativa*)-one of the most important cereal crops and a staple food for a large portion of the global population-is of paramount importance. In this regard, the utilization of advanced technologies such as molecular breeding, genetic engineering, and particularly genome editing has been recognized as an effective strategy to improve yield and increase resistance to biotic and abiotic stresses. One of the genes employed in rice breeding is the Deeper Rooting 1 (DRO1) gene, which plays a significant role in increasing root depth, thereby improving water and nutrient uptake-especially under drought stress conditions. The introduction of this gene into shallow-rooted rice varieties has led to the development of lines with deeper root systems, significantly enhancing plant performance under water-limited conditions. Given the necessity of biosafety assessment in genetically modified plants, particularly concerning the allergenic or sensitizing potential of novel proteins, this study focused on evaluating the safety of the DRO1 protein.

Material and method: In this research, following the complete sequence analysis of the DRO1 protein, a total of 172 fragments of 80 amino acids in length and 244 peptides of 8 amino acids were examined.

Result: none of which showed homology with known allergenic sequences. Furthermore, enzymatic digestion using digestive enzymes and three-dimensional structural analysis of the protein also indicated no allergenic or sensitizing potential. Based on the obtained results, the DRO1 protein can be considered biologically safe. Incorporating this gene into breeding programs can serve as an effective step toward enhancing rice drought tolerance, reducing water consumption, increasing productivity, and ultimately achieving food security and self-sufficiency in the production of this strategic crop.

Keywords: Allergenicity potential, Rice, Deeper Rooting1, Food security

مقدمه

در مهندسی ژنتیک اطمینان اولیه از ایمن بودن محصول پروتئینی ژن انتقالی دارای اهمیت است و عدم وجود اثرات بالقوه واکنش حساسیت‌زایی و آلرژی‌زایی در محصول ژن انتقالی می‌تواند به اطمینان اولیه در عدم مشاهده اثرات جانبی در مراحل آنالیز احتمال خطر و بررسی‌های ایمنی‌زیستی منجر شود. پیش‌بینی پتانسیل آلرژی‌زایی یک پروتئین، به ویژه در غذاهای جدید یکی از چالش‌های عمده در موضوع آلرژی مولکولی است. در این موضوع لازم است دو جنبه را از هم متمایز کرد: ایمنی‌زایی و واکنش متقابل. ایمنی‌زایی، پتانسیل یک پروتئین برای القای آنتی‌بادی‌های IgE را منعکس می‌کند، در حالی که واکنش متقابل، واکنش آنتی‌بادی‌های IgE (معمولاً از قبل موجود) با پروتئین هدف است. علاوه بر این دو موضوع، ارتباط بین پتانسیل اتصال IgE و علائم بالینی نیز مورد توجه قرار می‌گیرد. این مورد تحت تأثیر خواص فیزیکی (به عنوان مثال، ثبات و اندازه) و ویژگی‌های ایمونولوژیک (به عنوان مثال میل و ظرفیت اپی‌توپ) است. پیش‌بینی احتمال ایمنی‌زایی و واکنش متقابل آلرژن‌ها بر ایجاد شباهت‌ها و تفاوت‌های ساختاری بین آلرژن‌ها و بین آلرژن‌ها و غیر آلرژن‌ها تکیه دارد (۱). ابزارهای بیوانفورماتیک می‌توانند به پیش‌بینی و بررسی پتانسیل آلرژی‌زایی پروتئین‌ها کمک

کنند.

دانه های غلات هزاران سال به عنوان اجزای اصلی غذای انسان نقش مهمی در جوامع بشری ایفا کرده‌اند. در سراسر جهان، برنج، گندم و ذرت و تا حدودی جو، سورگوم و ارزن از محصولات غذایی اصلی هستند که برای بقای میلیاردها انسان ضروری هستند. بیش از ۵۰ درصد کالری دریافتی جهان مستقیماً از مصرف غلات ناشی می‌شود (۲). کاهش جهانی عملکرد محصول یا به عبارتی کاهش عملکرد واقعی نسبت به حداکثر پتانسیل محصول که برای برنج، گندم و ذرت در برخی از مناطق حدود ۳۰ تا ۶۰ درصد تخمین زده شده است، به کمبود آب و مواد مغذی نسبت داده می‌شود (۳). پیش‌بینی می‌شود برای ایجاد امنیت غذایی تا سال ۲۰۵۰، تقاضای غلات تا ۶۰ درصد افزایش یابد (۴) بنابراین لازم است رویکردهای اصلاحی فعلی صفاتی را در نظر بگیرند که با اصلاح آنها امکان ایجاد ارقامی فراهم شود که بتوانند شرایط رشد نامناسب و شرایط آب و هوایی سخت را تحمل کنند.

ساختار ریشه گیاهان در به حداقل رساندن خلأ عملکرد اهمیت دارد و زیربنای دومین انقلاب سبز در جهت برآورده کردن تقاضای غذایی انسان‌ها است (۵). علاوه بر عملکردهای استقرار گیاه و جذب آب و مواد مغذی توسط سیستم‌های ریشه، ذخیره‌سازی، سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌ها در روابط میکروبی‌های همزیست نقش مهمی دارند (۶ و ۷). ریشه‌ها در حال تبدیل شدن به هدف اصلی برای انقلاب سبز دوم هستند و اصلاح آنها برای تولید غلات غذایی پرمحصول مانند گندم و برنج ضروری به نظر می‌رسد (۸). متأسفانه، صفات ریشه در اصلاح به دلیل چالش‌های فنوتیپی بسیار نادیده گرفته می‌شوند، اما اگر بتوان از تنوع در صفات ساختار ریشه به طور کامل استفاده کرد، بسیار با ارزش خواهد بود (۹). تاکنون، تعداد زیادی از ژن‌ها که دارای نقش بالقوه‌ای در بهبود ساختار ریشه هستند با جزئیات شناسایی شده‌اند. ما در گزارش‌های قبلی انتقال ژن DRO1 را به همراه ژن‌های دیگر موثر بر ساختار ریشه

نویسنده ی مسئول: پژوهشگاه بیوتکنولوژی

کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و

ترویج کشاورزی، کرج ایران

آدرس الکترونیک: mthrh@yaho.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱۲/۲۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۰۶/۰۳

انتخاب شد تا پس از تایید ایمنی بالقوه آن، برای مهندسی ژنتیک برنج مورد استفاده قرار گیرد.

بررسی قرابت توالی پروتئین DRO1 برنج با توالی های متناظر از گیاهان تک لپه و دو لپه و کشف موتیف

توالی های متناظر با پروتئین DRO1 برنج از پایگاه NCBI دریافت و قرابت آنها بررسی شد. سپس برای جستجوی موتیف از پایگاه SMART و برای کشف موتیف از پایگاه MEME استفاده شد. موتیف یک الگوی توالی تقریبی است که به طور مکرر در گروهی از توالی های مرتبط رخ می دهد. الگوهای دارای شکاف با طول متغیر توسط MEME به دو یا چند موتیف جداگانه تقسیم می شوند. برای مقایسه موتیف مرتبط با آلرژن از پایگاه Tomtom (۱۷) استفاده شد. این پایگاه یک یا چند موتیف را با پایگاه داده ای از موتیف های شناخته شده (مانند JASPAR) مقایسه می کند. Tomtom موتیف ها را در پایگاه داده رتبه بندی می کند و برای هر تطابق قابل توجه یک تراز ایجاد می کند.

بررسی اثرات بالقوه آلرژی زایی و حساسیت زایی

برای بررسی اثرات بالقوه آلرژی زایی و حساسیت زایی پروتئین گذشونده توسط ژن DRO1 از چندین پایگاه استفاده شد که به شرح زیر هستند.

الف) پایگاه AllergenOnline (<http://www.allergenonline.org>) دسترسی به یک لیست آلرژن بررسی شده و پایگاه داده قابل جستجوی توالی را فراهم می کند که برای شناسایی خطر بالقوه واکنش متقابل آلرژیک پروتئین حاصل از بیان ژن DRO1 در نظر گرفته شد. این پایگاه برای کمک به ارزیابی ایمنی پروتئین هایی که ممکن است از طریق مهندسی ژنتیک یا از طریق روش های فرآوری مواد غذایی وارد غذاها شوند، طراحی شده است. هدف، شناسایی پروتئین هایی است که ممکن است به آزمایش های بیشتری نیاز داشته باشند، مانند اتصال IgE سرم (IgE binding)، آزادسازی هیستامین

به رقم تجاری برنج هاشمی گزارش کردیم (۱۲-۱۰). ژن DRO1 در افزایش طول سلول در نوک ریشه نقش دارد که باعث رشد نامتقارن ریشه و خم شدن ریشه به سمت پایین در پاسخ به نیروی جاذبه می شود. انتقال این ژن به یک رقم برنج با ریشه کم عمق، لاین حاصل را قادر می کند تا از خشکی توسط افزایش عمق ریشه دهی خود اجتناب کند و این امر منجر به حفظ عملکرد بالا در شرایط تنش خشکی در مقایسه با رقم اولیه خواهد شد. این ژن که به طور طبیعی در رقم وحشی برنج Kinandang patong وجود دارد، در ارقام زراعی مثل رقم هاشمی به دلیل ایجاد کدون پایان زودهنگام فاقد عملکرد است. بنابراین به منظور برگرداندن اثرات مفید این ژن در اجتناب از خشکی، توالی ناحیه کدکننده آن پس از بهینه سازی کدونی، از نظر ایمنی پروتئین حاصل با بررسی اثرات بالقوه آلرژی زایی و حساسیت زایی مورد ارزیابی قرار گرفت و سپس تحت نواحی تنظیمی گیاهی به برنج رقم هاشمی منتقل شد.

مواد و روش ها

جستجوی منابع و بررسی های بیوانفورماتیکی برای انتخاب ژن بالقوه ایمن و موثر در بهبود ساختار ریشه و تحمل به خشکی

مقالات مرتبط با عوامل ژنتیکی دخیل در تغییر ساختار ریشه برنج و تاثیر ساختار ریشه بر عملکرد و تحمل تنش های محیطی با تاکید بر استرس خشکی بررسی و بر این اساس ژن های کاندید مرتبط با صفات مهم ساختاری ریشه انتخاب شدند. یکی از این ژن های موثر در تغییر زاویه رشد ریشه و اجتناب از خشکی ژن DEEPER 1 ROOTING نام داشت. این ژن عامل به وجود آوردن ریشه عمیق و کنترل کننده زاویه رشد ریشه است که باعث طولی شدن سلول ها در نوک ریشه شده و با رشد نامتقارن سلول های نوک ریشه، سبب خم شدن ریشه در پاسخ به گرانش زمین خواهد شد. این ژن به دلیل وجود گزارش های معتبر از موثر بودن آن در افزایش تحمل به خشکی (۱۶-۱۳) به عنوان ژن کاندید برای انتقال به برنج به طور اولیه

ندارد. بنابراین توصیه شده است از حالت سوم یعنی بررسی توالی‌های کوتاه ۶ تا ۸ اسیدآمینه‌ای برای بررسی آلرژی‌زایی استفاده نشود، زیرا هیچ مدرک علمی مبنی بر پیش‌بینی واکنش متقاطع IgE وجود ندارد و فعالیت‌های بالینی مشترک را پیش‌بینی نمی‌کنند (۱۸).

(ب) پایگاه [PeptideCutter](https://web.expasy.org/peptide_cutter) (https://web.expasy.org/peptide_cutter) پایگاه دیگری است که محل‌های برش احتمالی توسط پروتئازها یا مواد شیمیایی را در یک توالی پروتئینی موردنظر پیش‌بینی می‌کند. در این تحقیق محل برش آنزیم‌های معده از جمله پپسین، تریپسین و کیموتریپسین روی پروتئین DRO1 مورد بررسی قرار گرفت و سپس قطعات حاصل از هضم برای بررسی پتانسیل آلرژی‌زایی و حساسیت‌زایی در پایگاه‌های AllergenOnline و Allermatchtm مورد بررسی قرار گرفتند.

(ج) پایگاه [Allermatch](https://www.allermatch.org) (<https://www.allermatch.org>) برای بررسی پتانسیل آلرژی‌زایی قطعات حاصل از شبیه‌سازی هضم پروتئین DRO1 با آنزیم‌های معده با طول بیش از ۸ اسیدآمینه مورد استفاده قرار گرفت. این پایگاه یک ابزار تحت وب است که با استفاده از آن می‌توان پروتئین موردنظر را با توالی پروتئین‌های آلرژی‌زا مقایسه کرد. این ابزار برای پیش‌بینی حساسیت‌زایی بالقوه پروتئین‌ها با رویکردهای بیوانفورماتیک بر اساس Codex alimentarius و FAO/WHO مورد حساسیت‌زایی مواد غذایی مشتق شده از طریق بیوتکنولوژی مدرن طراحی شده است (۲۰۱۹). آخرین به روز رسانی این پایگاه در ۵ سپتامبر ۲۰۲۲ انجام شده است و شامل ۲۵۶۹ توالی پلی‌پپتیدی، ۲۲۵۵ شناسه از UniProt، ۲۹ شناسه از UniProt با چندین زنجیره پلی پپتیدی و ۳۱۴ شناسه GenBank RefSeqProtein است. پایگاه داده (AllergenDB) Allermatchtm با استفاده از ترکیب UniProt و GenBank NCBI و COMPARE (منبع جامع پروتئین آلرژن UniProt و آلرژن WHO/IUIS) ساخته شده است.

(د) وب سرور 2 AllerCatPro (۲۱) برای پیش‌بینی پتانسیل حساسیت‌زایی پروتئین DRO1 مورد استفاده قرار

بازوفیل (release Basophil histamine) یا چالش in vivo برای ارزیابی واکنش متقابل بالقوه (In vivo challenge to evaluate potential cross-reactivity)، این پایگاه داده سالانه به روز می‌شود. نسخه چهارم آن در یک وب سایت عمومی در سال ۲۰۰۴ منتشر شد. این پایگاه در تاریخ ۲۵ می ۲۰۲۳ به نسخه ۲۲ به روز شده است. نسخه ۲۲ حاوی لیست جامعی از آلرژن‌های دریافت شده از منابع معتبر است. این پایگاه داده با هدف ارائه یک ابزار ساده و مفید که می‌تواند در ارزیابی ایمنی مواد غذایی مفید باشد، به صورت رایگان در دسترس است. این ابزار به محقق این امکان را می‌دهد تا توالی پروتئین مورد نظر خود را با توالی‌های موجود در پایگاه داده AllergenOnline، که به صورت سالانه به‌روزرسانی می‌شود، مقایسه کند. این کار برای ارزیابی پروتئین‌های جدید در محصولات اصلاح‌شده ژنتیکی یا در غذاهای جدید در نظر گرفته شده است.

حالت اول جستجوی کل توالی پپتیدی و مقایسه آن با آلرژن‌ها است. در جستجوی هم‌ترازی‌های کل طول توالی پپتیدی، تطابق بیشتر از ۵۰ درصد، نشان‌دهنده واکنش متقابل احتمالی است.

حالت دوم که بر اساس دستورالعمل‌های CODEX Alimentarius (۲۰۰۳) طراحی شده، توالی پروتئینی مورد نظر را به بخش‌هایی شامل پپتیدهای ۸۰ اسیدآمینه‌ای تبدیل و شباهت هر قطعه را با آلرژن‌ها جستجو می‌کند. بر اساس دستورالعمل کدکس پپتیدهای ۸۰ اسیدآمینه‌ای که شباهت آنها با آلرژن‌ها بیش از ۳۵ درصد باشد پتانسیل آلرژی‌زایی داشته و لازم است تحت آنالیزهای تکمیلی آزمایشگاهی قرار بگیرند.

حالت سوم جستجو برای تطابق دقیق هشت اسید آمینه است. برخی ضوابط نظارتی دنیا نتایج این جستجوی بسیار دقیق را هم درخواست می‌کنند. به هر حال نظر مراکز علمی مرتبط با بررسی احتمال آلرژی‌زایی این است که هیچ مدرکی مبنی بر اینکه تطابق هشت اسید آمینه بتواند پروتئینی را شناسایی کند که احتمالاً واکنش متقابل دارد در حالی که تطابق ۸۰ اسید آمینه‌ای آن نتوانسته باشد شباهت بالای ۳۵ درصد با آلرژن‌ها را نشان دهد، وجود

عمیق نقش دارند در چندین گیاه تک لپه‌ای و دو لپه‌ای مقایسه و نتایج آن در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌داد که پروتئین DRO1 برنج بیشترین قرابت را با پروتئین مرتبط در گیاه (A. برانچیان‌تا) با حدود ۸۷ درصد مطابقت نشان می‌دهد و سپس با توالی‌های پروتئین مرتبط از جنس و گونه‌های تریپتیکوم/اوراتو، آنجیلوپس تاسچی، ت. آئستیم، هوردم ولگار و پانیکوم ویرگاتوم حدود ۷۶-۶۹ درصد مطابقت دارد که همانطور که انتظار می‌رود همه آنها گیاهانی تک لپه‌ای هستند. به هر حال نتایج نشان می‌داد این توالی با توالی مرتبط از گیاهان فونیکس داکتیلیفر/ دیوسکورا/ کاینسیر که آنها نیز گیاهانی تک لپه‌ای هستند کمتر و بین ۴۳-۳۷ درصد است. همچنین این بررسی نشان داد که نزدیک‌ترین توالی‌های مرتبط با DRO1 برنج از منشأ گیاهان دو لپه‌ای مربوط به گیاهان کاریا/ یلینوینسنسیر، ریسینوس کامیونیز، تریپتیرگیوم ویلفوردی و جاگلانس میکروکاریا هستند که شباهت آنها بین ۳۶ تا ۳۷ درصد نشان داده شد (شکل ۱).

گرفت. این ابزار تحت وب می‌تواند برای پیش‌بینی پتانسیل حساسیت‌زایی پروتئین با دقت بهتری نسبت به سایر روش‌های محاسباتی و ویژگی‌های جدید استفاده شود که به محققان و ارزیابی‌کنندگان در تصمیم‌گیری آگاهانه کمک می‌کند. پایگاه 2 AllerCatPro با استفاده از توالی اسیدآمینه و ساختارهای سه بعدی، شباهت پروتئین‌های ورودی را در برابر جامع‌ترین مجموعه داده‌های پروتئین‌های قابل اعتماد مرتبط با حساسیت‌زایی پیش‌بینی می‌کند. این مجموعه داده‌ها در حال حاضر شامل ۴۹۷۹ پروتئین آلرژن، ۱۶۲ پروتئین کم آلرژیک و ۱۶۵ آلرژن خودایمنی با نظارت دستی متخصصان از پایگاه‌های داده زیر است.

نتایج

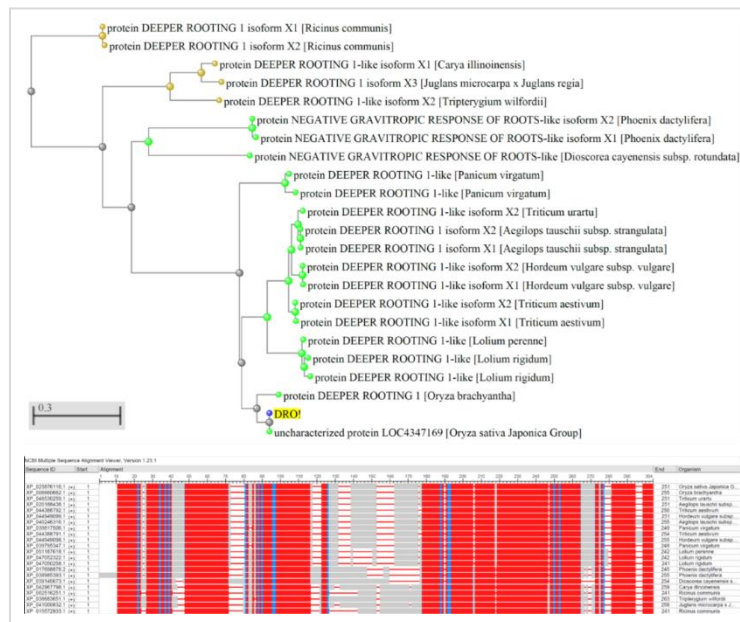
انتخاب ژن‌های کاندید، جداسازی ژن و طراحی سازه‌ها و انتقال ژن

توالی پروتئین مرتبط با DRO1 از منشأ برنج از پایگاه NCBI دریافت شد و حضور و قرابت این پروتئین با پروتئین‌هایی که پیش‌بینی می‌شد در ایجاد فنوتیپ ریشه WHO اتحادیه بین المللی انجمن‌های ایمونولوژیک^۱ (IUIS)؛ منبع جامع آلرژن پروتئین^۲ (COMPARE)؛ برنامه تحقیقاتی و منابع آلرژیک غذایی^۳ (FARRP)؛ UniProtKB و Allergome. وب سرور AllerCatPro 2 بصورت رایگان در آدرس <https://allercatpro.bii.a-star.edu.sg> در دسترس است.

¹ International Union of Immunological Societies

² Comprehensive Protein Allergen Resource

³ Food Allergy Research and Resource Program



جدول ۱. پیشگویی عملکرد پروتئین DRO1 برنج مورد استفاده در این تحقیق بر اساس ارتباطات پروتئینی

Predicted Functional Partners		Score	Neighborhood	Gene Fusion	Cooccurrence	Coexpression	Experiments	Databases	Textmining	[Homology]
OS04T0101800-01	Os04g0101800 protein (689 aa)	۰/۷۳۳							✓	
WOX11	WUSCHEL-related homeobox 11; Transcription factor which may be involved in developmental processes (By similarity). Promotes the development of crown roots (both initiation and elongation), main components of the fibrous root system, by regulating the expression of genes required for crown root development and hormone-responsive genes involved in cytokinin (e.g. RR1, RR2, RR3 and RR4) and auxin (e.g. IAA5, IAA11, IAA23 and IAA31) signaling; Belongs to the WUS homeobox family (262 aa)	۰/۴۹۹							✓	
ARL1	Adventitious rootless1; Expressed protein; LOB domain protein; Os03g0149100 protein (259 aa)	۰/۴۹۵							✓	
C68	Os02g0236100 protein; Putative SERK1 protein; cDNA clone-J013129G20, full insert sequence ; Belongs to the protein kinase superfamily. Ser/Thr protein kinase family (620 aa)	۰/۴۹۵							✓	
OST48	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit; Essential subunit of the N-oligosaccharyl transferase (OST) complex which catalyzes the transfer of a high mannose oligosaccharide from a lipid-linked oligosaccharide donor to an asparagine residue within an Asn-X-Ser/Thr consensus motif in nascent polypeptide chains (439 aa)	۰/۴۹۱							✓	
OS03T0811900-01	ADP-ribosylation factor; ADP-ribosylation factor, putative, expressed; Os03g0811900 protein ; Belongs to the small GTPase superfamily. Arf family (181 aa)	۰/۴۲۶							✓	
JAZ12	Protein TIFY 11d; Repressor of jasmonate (JA) responses (By similarity). May act on an initial response of JA-regulated gene expression toward drought tolerance as part of a BHLH148-TIFY11D/JAZ12-COI1A complex (171 aa)	۰/۴۲۲							✓	

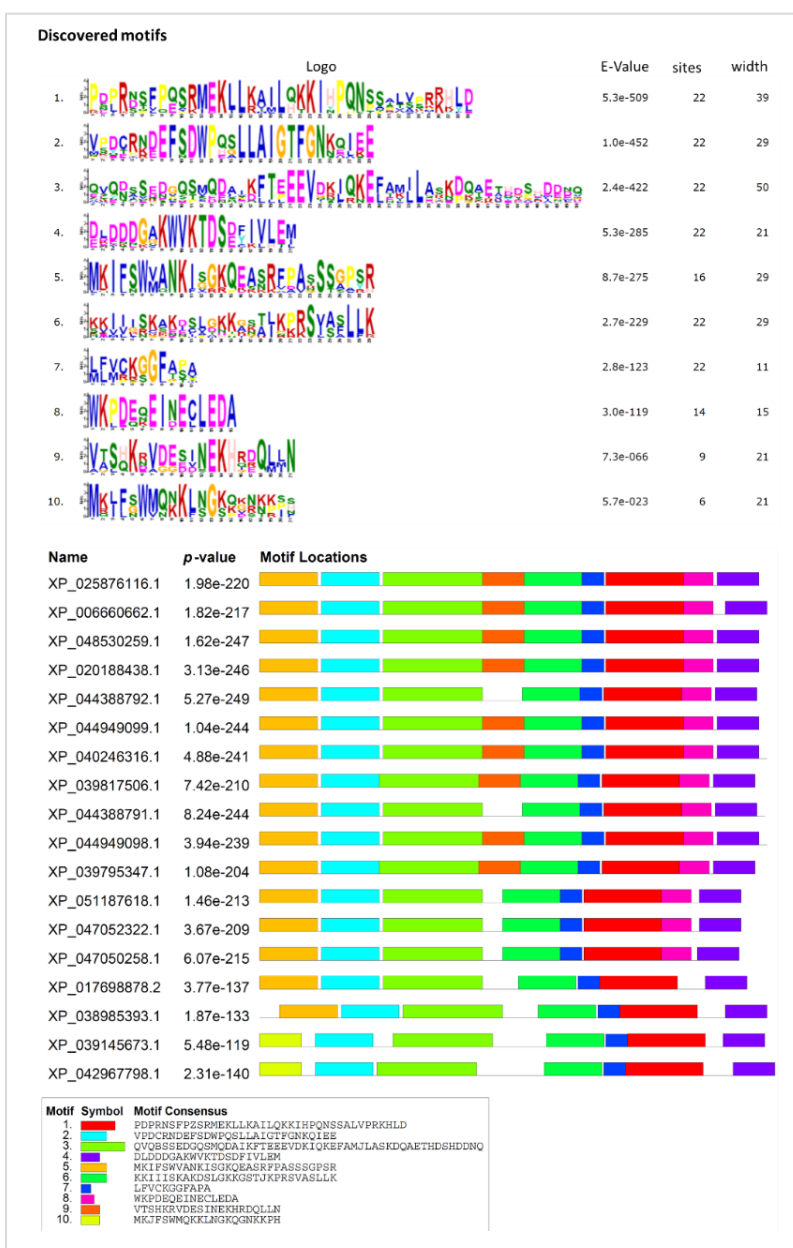
پایگاه SMART ([http://smart.embl-](http://smart.embl-heidelberg.de))

نتوانست موتیف دارای کارکردی برای ([heidelberg.de](http://smart.embl-heidelberg.de))

شناسایی موتیف DRO1

توالی اسیدآمینهای ژن DRO1 برنج پیدا کند (شکل ۲ و جدول ۱).
به دلیل اینکه پایگاه SMART نتوانست موتیف‌هایی را بر اساس پروتئین‌های شناخته شده قبلی برای ژن DRO1 برنج شناسایی کند بنابراین به منظور پیدا کردن موتیف‌های کارکردی از پایگاه MEME (<https://meme->) استفاده شد (22) که نتایج آن در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد از ۱۰ موتیف پیشگویی شده در این پایگاه، تعداد شش موتیف در ۲۲ پروتئین DRO1 از گونه‌های تک‌لپه و دولپه مورد بررسی در این تحقیق مشترک هستند.

توالی اسیدآمینهای ژن DRO1 برنج پیدا کند (شکل ۲ و جدول ۱).
به دلیل اینکه پایگاه SMART نتوانست موتیف‌هایی را بر اساس پروتئین‌های شناخته شده قبلی برای ژن DRO1 برنج شناسایی کند بنابراین به منظور پیدا کردن موتیف‌های کارکردی از پایگاه MEME (<https://meme->) استفاده شد (22) که نتایج آن در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد از ۱۰ موتیف پیشگویی شده در این پایگاه، تعداد شش موتیف در ۲۲ پروتئین DRO1 از گونه‌های تک‌لپه و دولپه مورد بررسی در این تحقیق مشترک هستند.



شکل ۳. نتایج پایگاه MEME در انتخاب موتیف های کارکردی پروتئین DRO1 برنج. از ده موتیف احتمالی (قسمت بالای شکل) که بر اساس E-Value مرتب شده اند تعداد شش موتیف در ۲۲ گیاه تک لپه و دولپه مورد بررسی در این تحقیق مشترک تشخیص داده شدند. Width: عرض موتیف الگویی با عرض ثابت را توصیف می کند، زیرا وجود هیچ شکافی در موتیف در پایگاه MEME مجاز نیست. Sites: تعداد سایت هایی که در ساخت موتیف نقش دارند را نشان می دهد. نتایج نشان می دهد

بررسی ایمنی پروتئین حاصل از تراژن DRO1

توالی پپتیدی DRO1 مورد استفاده در این تحقیق با طول ۲۵۱ اسید آمینه در پایگاه AllergenOnline مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز ۱۷۲ قطعه ۸۰ اسید آمینه ای در کل توالی این پروتئین شباهت بالای ۳۵ درصد با هیچ

آلرژنی نشان نداد (شکل ۴-بالا). همچنین ۲۴۴ قطعه پپتید ۸ اسید آمینه ای کل این توالی با هیچ توالی آلرژنی منطبق نشدند (شکل ۴).

80mer Sliding Window Search Results	
Database	AllergenOnline Database v21 (February 14, 2021)
Input Query	>query mkifswvankisgkqeanrfpanssapyranvscrkdefsdwpqsliaigtfgnkqiee vaqvnsdndvsvqdtvkfteeevdkirkefetllaikdqaearshdddqvglkqrad gednekhirqlinkriivsksknslgkkgntlkprsvasllklfmckggfts vvppeprnt fpqsrmekllkailqkkihpnqnsstlvakrhldwkpdeinecledalrlddddgakv ktseyivlem
Length	251
Number of 80 mers	172
Number of Sequences with hits	0
No Matches of Greater than 35% Identity Found	
AllergenOnline Database v21 (February 14, 2021)	
<u>>query.</u>	
number of 8mer = 244	
Number of Sequences with at least one 8mer match = 0	

شکل ۴. نتایج پایگاه AllergenOnline برای بررسی احتمال آلرژی زایی پروتئین حاصل از تراژن DRO1. هیچ شباهتی با آلرژن ها در این بررسی مشاهده نشد.

نتایج بررسی In-silico هضم DRO1 توسط آنزیم های پپسین، تریپسین و کیموتریپسین در پایگاه PeptideCutter، ایجاد ۲۵۱ قطعه از این پروتئین را نشان

داد (جدول ۲) که تعداد زیادی از آنها یک تا دو اسید آمینه و بقیه قطعات دارای طول زیر ۸ اسید آمینه بودند بجز دو قطعه ۲۳ و ۹ اسید آمینه ای (جدول ۲ - با رنگ قرمز

مشخص شده است). با توجه به اینکه در آنالیز پایگاه AllergenOnline تمام احتمالات آلرژی‌زایی قطعات ۸ تایی این پروتئین مورد بررسی قرار گرفته و شباهتی به آلرژن‌ها نشان داده نشده بود، بنابراین تنها پتانسیل آلرژی‌زایی این دو قطعه ۲۳ و ۹ اسیدآمینهای در پایگاه‌های AllergenOnline و Allermatchtm مورد بررسی قرار گرفت. توالی ۲۳ اسیدآمینهای

همه DRO1 با آنزیم‌های معده در این دو پایگاه هیچ شباهتی با آلرژن‌ها نشان نداد. توالی ۹ اسیدآمینهای PDETEINEC نیز در پایگاه AllergenOnline شباهتی به آلرژن‌ها نشان نداد ولی در پایگاه Allermatchtm در برش ۶ تایی شباهت ۲۵ درصدی به یک پروتئاز سرین نشان داد (شکل ۵).

جدول ۲. نتایج برش پروتئین حاصل از تراژن DRO1 توسط آنزیم‌های پپسین، تریپسین و کیموتریپسین

Position of cleavage site	Name of cleaving enzyme(s)	Resulting peptide sequence	Peptide length [aa]	Peptide mass [Da]
۱	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	M	۱	۱۴۹/۲۰۸
۲	Trypsin	K	۱	۱۴۶/۱۸۹
۳	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	I	۱	۱۳۱/۱۷۵
۴	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	F	۱	۱۶۵/۱۹۲
۵	Pepsin (pH>2)	S	۱	۱۰۵/۰۹۳
۶	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH>2)	W	۱	۲۰۴/۲۸۸
۱۰	Trypsin	VANK	۴	۴۳۰/۵۰۵
۱۴	Trypsin	ISGK	۴	۴۰۳/۴۹۷
۱۹	Trypsin	QEANR	۵	۶۱۶/۶۳۲
۲۰	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	F	۱	۱۶۵/۱۹۲
۲۷	Pepsin (pH>2)	PANSSAP	۷	۶۴۲/۶۶۶
۲۸	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	Y	۱	۱۸۱/۱۹۱
۲۹	Trypsin	R	۱	۱۷۴/۲۰۳
۳۷	Trypsin	ANVSDCRK	۸	۸۹۱/۹۹۸
۴۰	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	DEF	۳	۴۰۹/۳۹۶
۴۳	Pepsin (pH>2)	SDW	۳	۴۰۶/۳۹۵
۴۶	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	PQS	۳	۳۳۰/۳۴۱
۴۷	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵

	Pepsin (pH>2)			
۴۸	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۵۲	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	AIGT	۴	۳۶۰/۴۱۰
۵۳	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	F	۱	۱۶۵/۱۹۲
۵۶	Trypsin	GNK	۳	۳۱۷/۳۴۵
۷۹	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2) Trypsin	QIEEVAQVENSNDNVQSVQDTVK	۲۳	۲۵۴/۶۸۴
۸۹	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	F	۱	۱۶۵/۱۹۲
۸۷	Trypsin	TEEEVDK	۷	۸۴۸/۸۶۲
۸۹	Trypsin	IR	۲	۲۸۷/۳۶۲
۹۰	Trypsin	K	۱	۱۴۶/۱۸۹
۹۲	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	EF	۲	۲۹۴/۳۰۷
۹۴	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	ET	۲	۲۴۸/۲۳۶
۹۵	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۹۶	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۹۹	Trypsin	AIK	۳	۳۳۰/۴۲۸
۱۰۶	Trypsin	DQAEAQR	۷	۸۱۶/۸۲۶
۱۱۴	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	SHDDDQVG	۸	۸۷۱/۸۱۶
۱۱۵	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۱۱۷	Trypsin	QK	۲	۲۷۴/۳۲۰
۱۱۸	Trypsin	R	۱	۱۷۴/۲۰۳
۱۲۶	Trypsin	ADGEDNEK	۸	۸۷۶/۸۳۲
۱۲۷	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	H	۱	۱۵۵/۱۵۶
۱۲۹	Trypsin	IR	۲	۲۸۷/۳۶۲
۱۳۰	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	Q	۱	۱۴۶/۱۴۶
۱۳۱	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۱۳۴	Trypsin	INK	۳	۳۷۳/۴۵۳
۱۳۵	Trypsin	R	۱	۱۷۴/۲۰۳
۱۴۰	Trypsin	IIVSK	۵	۵۵۸/۷۱۹
۱۴۲	Trypsin	SK	۲	۲۳۳/۲۶۸
۱۴۵	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3)	NSL	۳	۳۳۲/۳۵۷

	Pepsin (pH>2)			
۱۴۷	Trypsin	GK	۲	۲۰۳/۲۴۱
۱۴۸	Trypsin	K	۱	۱۴۶/۱۸۹
۱۵۱	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	GNT	۳	۲۹۰/۲۷۶
۱۵۲	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۱۵۵	Trypsin	KPR	۳	۳۹۹/۴۹۴
۱۵۹	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	SVAS	۴	۳۶۲/۳۸۳
۱۶۰	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۱۶۱	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۱۶۲	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2) Trypsin	K	۱	۱۴۶/۱۸۹
۱۶۳	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۱۶۴	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	F	۱	۱۶۵/۱۹۲
۱۶۵	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	M	۱	۱۴۹/۲۰۸
۱۶۷	Trypsin	CK	۲	۲۴۹/۳۲۸
۱۷۰	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	GGF	۳	۲۷۹/۲۹۶
۱۸۷	Trypsin	TSVVPEPR	۸	۸۸۴/۰۰۰
۱۸۱	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	NTF	۳	۳۸۰/۴۰۱
۱۸۵	Trypsin	PQSR	۴	۴۸۶/۵۲۸
۱۸۶	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	M	۱	۱۴۹/۲۰۸
۱۸۸	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2) Trypsin	EK	۲	۲۷۵/۳۰۵
۱۸۹	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۱۹۰	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۱۹۱	Trypsin	K	۱	۱۴۶/۱۸۹
۱۹۴	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	AIL	۳	۳۱۵/۴۱۳
۱۹۶	Trypsin	QK	۲	۲۷۴/۲۳۰
۱۹۷	Trypsin	K	۱	۱۴۶/۱۸۹
۲۰۵	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	IHPQNSST	۸	۸۸۲/۹۲۸
۲۰۶	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵

۲۰۹	Trypsin	VAK	۳	۳۱۶/۴۰۱
۲۱۰	Trypsin	R	۱	۱۷۴/۲۰۳
۲۱۱	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	H	۱	۱۵۵/۱۵۶
۲۱۲	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۲۱۴	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	DW	۲	۳۱۹/۳۱۷
۲۱۵	Trypsin	K	۱	۱۴۶/۱۸۹
۲۲۴	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	PDETEINEC	۹	۱۰۴۹/۰۷۴
۲۲۵	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۲۲۸	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	EDA	۳	۳۳۳/۲۹۸
۲۲۹	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۲۳۰	Trypsin	R	۱	۱۷۴/۲۰۳
۲۳۱	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	D	۱	۱۳۳/۱۰۴
۲۳۲	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۲۳۸	Pepsin (pH>2) Trypsin	DDDGAK	۶	۶۱۹/۵۸۶
۲۳۹	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH>2)	W	۱	۲۰۴/۲۲۸
۲۴۱	Trypsin	VK	۲	۲۴۵/۳۲۲
۲۴۵	Pepsin (pH>2)	TDSE	۴	۴۵۰/۴۰۳
۲۴۶	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH>2)	Y	۱	۱۸۱/۱۹۱
۲۴۸	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	IV	۲	۲۳۰/۳۰۷
۲۴۹	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۲۵۱	end of sequence	EM	۲	۲۸۷/۳۲۳

6 Amino Acid Wordmatch

Database : AllergenDB_propeptides_removed

No	Db	Description	No of exact wordmatches	% of exact wordmatches	External db	Scientific Name	Detailed Information
1	UniProt	Venom serine protease	1	25.00	Q7Z269 ²	Polistes dominula	Go

Analyzed 4 windows

1. Number of the hit, best hit comes first
 2. External Database:
 = UniProt : UniProt Protein Knowledgebase
 = GenBank : GenBank NCBI (RefSeqProtein)
 3. Description of the sequence
 4. The number of exact 6 aa hits the input sequence had with this allergen
 5. The Percentage of exact hits the input sequence is found to hit this allergen sequence
 6. External database accession id linking to this database, the superscript ids indicate which database this is:
 = U : UniProt
 = G : GenBank NCBI (RefSeqProtein)
 7. Species name of the allergen
 8. Links to a page with specific details on this database sequence and the part of the input sequence aligning to the database sequence.

6 Amino Acid Wordmatch against SP4_POLDO

Database : AllergenDB_propeptides_removed

Allergen Id	SP4_POLDO
Allermatchtm Database	UniProt
Allergen Name	Pol d 4
Source database	Uniprot
Accession Id	Q7Z269
External link	http://www.uniprot.org/uniprot/Q7Z269
Scientific Name	Polistes dominula
Common Name	European paper wasp
Description	Venom serine protease
Size mature protein	258
Sequence	reenckcgwdnpsrivngveteinefpmvarliypspgmycggtiitpqhivtaahclqk ykrntnytgihvvgehdyyttdtetnvtkrytiaevtihpynshndiaivktnerfeys mkvgpvcplpfymtrnltnetvtalgwglryngqnskvirkvdihvitreqcethygaa iananllctfdvgrdacqndsggpilwrspttdnlilvgvvnfgrtcaddapgggnarvts fmfihnatigetckad

Input Sequence

The '#' denotes which parts of the input sequence have an exact 6 aa match against this specific database sequence

0 : PDETEINEC
 0 : #####

Database Sequence

The '#' denotes which parts of the database sequence have an exact 6 aa match against the input sequence

0 : reenckcgwdnpsrivngveteinefpmvarliypspgmycggtiitpqhivtaahclqk
 0 : #####

60 : ykrntnytgihvvgehdyyttdtetnvtkrytiaevtihpynshndiaivktnerfeys
 60 :

120 : mkvgpvcplpfymtrnltnetvtalgwglryngqnskvirkvdihvitreqcethygaa
 120 :

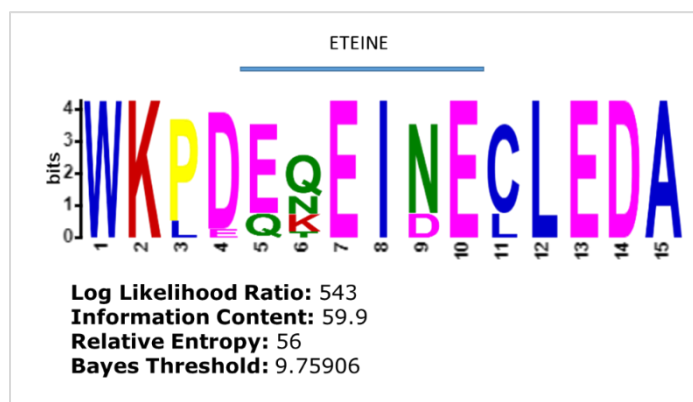
180 : iananllctfdvgrdacqndsggpilwrspttdnlilvgvvnfgrtcaddapgggnarvts
 180 :

240 : fmfihnatigetckad
 240 :

شکل ۵. نتیجه بررسی شباهت قطعه ۹ اسیدآمینهای (PDETEINEC) حاصل از هضم پروتئین DRO1 با آنزیم های پپسین، تریپسین و کموترپسین در پایگاه Allermatchtm

این ۱۴ توالی DRO مشترک و در سه اسیدآمین به بین این توالی ها اختلاف است که بیشترین اختلاف مربوط به حضور اسیدآمین ترئونین (دومین اسیدآمین مچ شده با آلرژن) نشان داده شده است. بر اساس جدول ۳ حضور این موتیف با بیشترین مطابقت بین توالی های DRO1 انتخاب شده مربوط به *H. vulgare* و با $P\text{-value}$ $2/49e-19$ بوده است.

بررسی ما نشان داد توالی ۶ تایی مرتبط با آلرژن مربوط به اسیدهای آمینه ۲۱۸ تا ۲۲۳ در موتیف هشتم کشف شده توسط پایگاه MEME از پروتئین DRO1 بوده (شکل ۳ بالا) و در ۱۴ توالی از ۲۲ توالی انتخاب شده ما حضور دارد. بررسی بیشتر این موتیف در شکل ۶ و جدول ۳ نشان داده شده است. محل این شش اسیدآمین (ETEINE) در این موتیف ۱۵ اسیدآمین ای نشان می دهد سه اسیدآمین آن در



شکل ۶. الگوی تشخیص داده شده توسط پایگاه MEME برای توالی ETEINE حاصل از هضم شبیه سازی شده پروتئین DRO1 برنج با آنزیم های معده

آمین ترئونین با حداقل تعداد در الگوی این موتیف (جایگاه ششم) وجود دارد.

این الگو که در موتیف هشتم معرفی شده در این تحقیق برای پروتئین DRO1 برنج وجود دارد نشان داد شباهت آن به آلرژن پروتئاز سرین بسیار ناچیز است به ویژه اینکه اسید

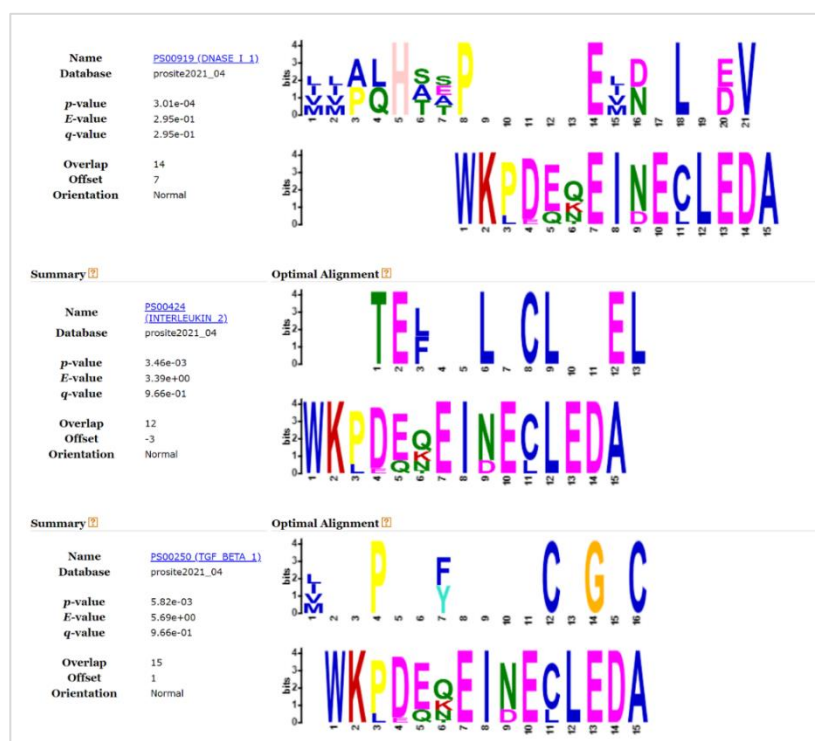
جدول ۳. سایت موتیف (موتیف هشتم معرفی شده برای پروتئین DRO1 برنج) با ۱۰ اسیدآمین کناری در دو طرف (SALAPRRHLDWKPDEQEINECLEDALRDLDDGAK) در ۱۴ توالی متناظر با DRO1 از گیاهان مختلف

$p\text{-value}$	Start	Name	ترتیب قرابت به DRO1 برنج
2.49e-19	۲۱۴	XP_044949098.1	۱۰
2.49e-19	۲۱۳	XP_044388791.1	۹
2.49e-19	۲۱۴	XP_040246316.1	۷
2.49e-19	۲۱۴	XP_044949099.1	۶

۵	XP_044388792.1	۲۱۳	2.49e-19
۴	XP_020188438.1	۲۱۴	2.49e-19
۳	XP_048530259.1	۲۱۴	2.49e-19
۱	XP_025876116.1	۲۱۴	1.36e-18
۱۱	XP_039795347.1	۲۱۲	1.61e-17
۸	XP_039817506.1	۲۱۲	1.61e-17
۲	XP_006660662.1	۲۱۴	2.32e-17
۱۴	XP_047050258.1	۲۰۳	3.21e-16
۱۳	XP_047052322.1	۲۰۳	3.21e-16
۱۲	XP_051187618.1	۲۰۳	3.21e-16

E-value نسبت به موتیف شماره ۸ در شکل ۷ نشان داده شده است و نشان دهنده این است که شش اسیدآمین به ترتیب با آلرژن در موتیف‌های شناخته شده توسط این پایگاه وجود ندارد.

موتیف دارای توالی حاصل از هضم شبیه‌سازی شده پروتئین DRO1 برنج با آنزیم‌های معده در برش ۶ تایی در پایگاه Tomtom نیز بررسی شد. نتایج مربوط به سه موتیف شناخته شده پیدا شده توسط این پایگاه بر اساس رتبه‌بندی



شکل ۷. نتیجه بررسی موتیف هشتم معرفی شده برای پروتئین DRO1 برنج در پایگاه Tomtom

بینی پتانسیل حساسیت‌زایی است (۲۱) استفاده شد. این پایگاه که اخیراً توسعه داده شده پیش‌بینی پتانسیل آلرژی‌زایی توالی‌های پروتئین را هم بر اساس شباهت توالی اسید آمینه و هم بر اساس شباهت ساختارهای سه بعدی آنها بررسی کرده و از مجموعه داده‌های جامع برای این منظور استفاده می‌کند. نتایج این پایگاه نه تنها به طور ۱۰۰ درصد عدم وجود شواهدی دال بر آلرژین بودن این پروتئین را نشان داد بلکه حتی عدم شباهت DRO1 به پروتئین‌هایی با آلرژی‌زایی کم و نیز عدم شباهت به آلرژن‌های خودایمنی را نیز نشان داد. نتایج این پایگاه در شکل ۸ نشان داده شده و هیچ شواهدی مبنی بر شباهت به آلرژن‌ها و پتانسیل آلرژی‌زایی در آن یافت نشده است.

با توجه به اینکه نتایج ما ایمن بودن بالقوه پروتئین DRO1 را نشان می‌داد ساختار سه بعدی این پروتئین نیز برای اطمینان بیشتر از عدم شباهت با پروتئاز سرین که در برش ۶ تایی به دست آمده بود در پایگاه Phyre2 (۲۳) به دست آمد و مقایسه شد و عدم شباهت ساختار سه بعدی آنها تایید شد (شکل ۸).

بنابراین نتایج این تحقیق نشان داد شواهدی مبنی بر آلرژی‌زایی و حساسیت‌زایی پروتئین DRO1 برنج به صورت بالقوه وجود ندارد. برای اطمینان بیشتر از عدم پتانسیل آلرژی‌زایی و حساسیت‌زایی این پروتئین، از پایگاه AllerCatPro 2.0 نیز که یک وب سرور جدید برای پیش

AllerCatPro 2.0 Results

Protein sequence of interest					Predicted most similar allergen (non-autoimmune allergens)	Potential cross-reactivity of query protein (# and links)	Protein info, functionality of most similar allergen				Clinical relevance of most similar allergen		Similarity to most similar allergen			Similarity to allergen and resulting predicted evidence for allergenicity		Similarity to autoimmune allergen (% identity to closest human hit)	Similarity to low allergenic protein (% identity to closest hit)	
Query#	Name	Sequence Length	Gluten allergens (# of Q-repeats)	# of 3x6-mer overlaps	Protein allergen		Species	UniProt/NCBI	Functionality (SUPFAM)	Pfam	InterPro	IgE prevalence	Allergen info	% Identity, linear 60 aa window	% Identity, 3D epitope	Show 3D epitope	Result	Comment		
1	DRO	251	0	-	No significant hit (E-value threshold 0.001)	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	no evidence	no hits	-	-

Download result as comma-separated table (can also be opened in Excel)

Summary result (Model 2.0 cv 1.1):

strong evidence

0/1 (0.0%)

weak evidence

0/1 (0.0%)

no evidence

1/1 (100.0%)

no hits

1

شکل ۸. تایید ایمن بودن پروتئین DRO1 برنج در پایگاه AllerCatPro 2.0 وب سروری برای پیش‌بینی پتانسیل حساسیت‌زایی پروتئین (۲۱)

تولیدات جهانی آن در آسیا است. به دلیل مصرف زیاد آب در کشت برنج ارائه راهکارهایی که بتوانند میزان مصرف آب را در کشت برنج کاهش دهند در جهت دستیابی به امنیت

بحث و نتیجه‌گیری

برنج غذای اصلی بیش از نیمی از جمعیت جهان است. این محصول در بیش از ۱۰۰ کشور کشت می‌شود و ۹۰ درصد

به سمت عمق خاک رشد کنند (۲۷). ریشه عمیق، صفتی پیچیده و ترکیبی از اثرات زاویه رشد ریشه، طول ریشه اولیه و ریشه های گره ای است (۲۸). ژن DRO1 رابطه ای عکس با اکسین دارد که در طول شدن سلول ها در راس ریشه که سبب رشد نامتقارن ریشه و گره خوردگی انتهایی ریشه در پاسخ به جاذبه زمین می شود، دخالت دارد (۲۸). این ژن در شرایط خشکی نقش مناسبی در افزایش طول ریشه و افزایش جذب آب و مواد غذایی دارد. انتقال DRO1 به یک رقم برنج با ریشه کم عمق، لاین حاصل را قادر ساخت تا از خشکی توسط افزایش عمق ریشه دهی خود اجتناب کند و این امر منجر به حفظ عملکرد بالا در شرایط تنش خشکی در مقایسه با رقم اولیه شاهد شد (۱۳). در تحقیق مذکور، بیوماس و طول ریشه تغییر چندانی نداشت ولی میزان محصول نهایی (دانه های پر شده) در تنش خشکی متوسط و شدید حدود ۳۰ درصد افزایش نشان داد (۱۵). مطالعات نشان دادند که ژن DRO1 توانایی افزایش جذب نیتروژن را داشته و همچنین با تنظیم جریان سیتوکینین، نقش مهمی را در پر شدن دانه ها را در شرایط مزرعه ایفا می کند (۱۴). در این تحقیق علاوه بر تایید ایمنی بالقوه پروتئین DRO1 که بیان دائمی آن را در لاین های حاصل فاقد احتمال خطر آلرژی زایی و حساسیت زایی پیش بینی می کند، بیان مختص ریشه و عدم حضور پروتئین حاصل بذر نیز می تواند در اطمینان بیشتر از ایمنی محصولات غذایی حاصل موثر باشد. بررسی های ایمنی زیستی تضمین بهره برداری از فواید قطعی بیوتکنولوژی مدرن و مدیریت آثار جانبی احتمالی کاربرد این فناوری را دربرداشته و استفاده از مزایای مهندسی ژنتیک در جهت امنیت غذایی را در پی خواهد داشت (۲۹). همچنین در این تحقیق منشا ژن DRO1 از یکی از گونه های برنج بوده و انتقال ژن های مفید از گونه های قابل تلاقی از طریق مهندسی ژنتیک به گیاه هدف که به سیس ژنسیس و اینتراژنسیس معروف است در برخی کشورها با قوانین کمتر سختگیرانه ای مواجه هستند. بدیهی است آزمایشات تکمیلی ایمنی زیستی و فیزیولوژی در مراحل بعدی پژوهشی مورد نیاز خواهند بود.

غذایی این محصول موثر خواهند بود. در این تحقیق پروتئین DRO1 از منشا یک گونه وحشی برنج به منظور استفاده اثرات مفید آن در بهبود ساختار ریشه در جهت تحمل به خشکی و افزایش عملکرد گیاه بررسی شد. پس از شناسایی پروتئین های متناظر آن در گیاهان تک لپه و دولپه و شناسایی موتیف ها، ارزیابی پتانسیل آلرژی زایی و ایمنی زایی آن نشان داد که فاقد هر گونه شباهت توالی و ساختار سه بعدی با آلرژن های شناخته شده بوده و می توان آن را به طور بالقوه ایمن در نظر گرفت و با انتقال این ژن به صورت بیش بیان و نیز مختص ریشه در برنج تجاری رقم هاشمی به لاین هایی دست یافت که در شرایط کم آبی عملکرد مناسبی از خود نشان دهند. در سیستم های تولید دیم، ظرفیت گیاهان زراعی برای جذب آب از حجم بیشتری از خاک برای پایداری عملکرد بسیار مهم است و تا حد زیادی به سیستم ریشه عمیق بستگی دارد. در این زمینه، ژن DRO1 در برنج به عنوان یک تنظیم کننده زاویه ریشه شناسایی شده است (۲۴ و ۲۵). رقم برنج کیناندانگ پاتانگ (KP) با یک نسخه کامل از DRO1 ریشه ای عمودی با زاویه تند را نشان می دهد، در حالی که رقم برنج IR64 دارای ریشه های کم عمق تری است که به یک نسخه ناقص از آلل DRO1 نسبت داده می شود (۲۵). تحقیقات ما نیز نشان داد رقم هاشمی که در بین مردم کشور ما از بازار پسندی خوبی برخوردار است به دلیل وجود نسخه ناقص این ژن نمی تواند از مزایای آن در بهبود ساختار ریشه، تحمل خشکی و بهبود عملکرد استفاده کند (۱۲-۱۰). ریشه زایی عمیق در برنج برای تحمل به خشکی، جذب نیتروژن، جریان سیتوکینین بیشتر در طول پر شدن دانه و عملکرد بیشتر محصول مرتبط است (۱۴). ارقام مختلفی از برنج وجود دارند که دارای سیستم ریشه ای متفاوتی هستند (۲۶). ارقام زراعی مانند IR64 که به طور وسیعی در آسیا کشت می شود دارای ریشه سطحی هستند، در حالی که رقم KP، ریشه دهی عمیق را نشان داده است (۱۳). ژن مسئول این صفت، DRO1 است (۲۵). بیان بالای DRO1 سبب تغییر زاویه رشد ریشه شده، منجر می شود که ریشه ها

منابع

1. Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(2):228–38.
2. Sarwar MH, Sarwar MF, Sarwar M, Qadri NA, Moghal S. The importance of cereals (Poaceae: Gramineae) nutrition in human health: A review. *J Cereal oilseeds.* 2013;4(3):32–5.
3. Mueller ND, Gerber JS, Johnston M, Ray DK, Ramankutty N, Foley JA. Closing yield gaps through nutrient and water management. *Nature.* 2012;490(7419):254.
4. Ray DK, Mueller ND, West PC, Foley JA. Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLoS One.* 2013;8(6):e66428.
5. Luo L, Xia H, Lu B-R. Crop breeding for drought resistance. Vol. 10, *Frontiers in plant science.* Frontiers Media SA; 2019. p. 314.
6. Khan MA, Gemenet DC, Villordon A. Root system architecture and abiotic stress tolerance: current knowledge in root and tuber crops. *Front Plant Sci.* 2016;7:1584.
7. Shorinola O, Kaye R, Golan G, Peleg Z, Kepinski S, Uauy C. Genetic screening for mutants with altered seminal root numbers in hexaploid wheat using a high-throughput root phenotyping platform. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 2019;9(9):2799–809.
8. Gewin V. An underground revolution: plant breeders are turning their attention to roots to increase yields without causing environmental damage. Virginia Gewin unearths some promising subterranean strategies. *Nature.* 2010;466(7306):552–4.
9. Maqbool S, Hassan MA, Xia X, York LM, Rasheed A. Root system architecture in cereals : progress , challenges and perspective. 2022;23–42.
10. Zandi M, Hosseini R, Mohsenpour M, HOSSEINI SG, Ghareyazie B. Transformation of DRO1, OsNAC5, OsEXPA8 genes in order to improve rice root architecture modification and improved drought tolerance in rice. 2019;
11. Ghorbanzadeh Z, Kazemi Alamouti M, Pourhang L, Mousavi Pakzad SM, Moatamed E, Mapar M, et al. Identification and investigation of DRO1 gene in rice cultivar Hashemi and its simultaneous transfer with OsCKX4 gene to improve root structure. *Crop Biotechnol.* 2022;11(36):49–62.
12. Kazemi M, Ghorbanzadeh Z, Pourhang L, Mousavi pakzad SM, Moatamed E, Mapar M, et al. Rice genetic engineering using transformation of Deeper Rooting1 and Phosphorus-Starvation Tolerance1 genes. *Agric Biotechnol J.* 2022;14(1):1–20.
13. Uga Y, Okuno K, Yano M. DRO1 , a major QTL involved in deep rooting of rice under upland field conditions. 2011;62(8):2485–94.
14. Arai-Sanoh Y, Takai T, Yoshinaga S, Nakano H, Kojima M, Sakakibara H, et al. Deep rooting conferred by DEEPER ROOTING 1 enhances rice yield in paddy fields. *Sci Rep.* 2014;4:5563.
15. Uga Y, Kitomi Y, Yamamoto E, Kanno N, Kawai S, Mizubayashi T, et al. A QTL for root growth angle on rice chromosome 7 is involved in the genetic pathway of DEEPER ROOTING 1. *Rice.* 2015;8(1):8.
16. Kitomi Y, Itoh J, Uga Y. Genetic Mechanisms Involved in the Formation of Root System Architecture. 2018. 241-274 p.
17. Gupta S, Stamatoyannopoulos JA, Bailey TL, Noble WS. Quantifying similarity between motifs. *Genome Biol.* 2007;8:1–9.
18. Goodman RE, Ebisawa M, Ferreira F, Sampson HA, van Ree R, Vieths S, et al. AllergenOnline: a peer-reviewed, curated allergen database to assess novel food proteins for potential cross-reactivity. *Mol Nutr Food Res.* 2016;60(5):1183–98.

19. Codex Alimentarius Commission. Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants. Vol. 45, CAC/GL. 2003.
20. FAO/WHO. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology–Allergenicity of Genetically Modified Foods–Rome, 22–25 January 2001. Rome, Food and Agriculture Organisation of the United Nations. 2001.
21. Nguyen MN, Krutz NL, Limvipphuvadh V, Lopata AL, Gerberick GF, Maurer-Stroh S. AllerCatPro 2.0: a web server for predicting protein allergenicity potential. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(W1):W36–43.
22. Bailey TL, Elkan C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in bipolymers. 1994;
23. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling , prediction and analysis. *Nat Protoc.* 2015;10(6):845–58.
24. Uga Y. Quantitative measurement of root growth angle by using the basket method. *Methodol root drought Stud rice Philipp Int Rice Res Inst.* 2012;22–6.
25. Uga Y, Sugimoto K, Ogawa S, Rane J, Ishitani M, Hara N, et al. Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions. *Nat Genet.* 2013;(August):1–9.
26. Uga Y, Ebana K, Abe J, Morita S, Okuno K, Yano M. Variation in root morphology and anatomy among accessions of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) with different genetic backgrounds. *Breed Sci.* 2009;59(1):87–93.
27. Kondo M, Murty MVR, Aragones D V. Characteristics of root growth and water uptake from soil in upland rice and maize under water stress. *Soil Sci Plant Nutr.* 2000;46(3):721–32.
28. Araki H, Morita S, Tatsumi J, Iijima M. Physiol-morphological analysis on axile root growth in upland rice. *Plant Prod Sci.* 2002;5(4):286–93.
29. Mohsenpour M, Kahak S, Ghareyazie B. Genetic Engineering and Food Security. *Strateg Res J Agric Sci Nat Resour.* 2018;3(2):195–208.

