

Bioinformatics study of ascorbate peroxidase (APX) gene family in *Camellia sinensis* genome

Nahid Azami¹, Ali Aalami¹(ORCID: 0000-0002-6791-833X), Amin Abedi¹

1. Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

Correspondence:

Ali Aalami

Email: ali_aalami@guilan.ac.ir

Received: 8, May 2024

Accepted: 1, Jul. 2024

How to cite:

Azami, N., Aalami, A., & Abedi, A. (2024). Bioinformatics study of ascorbate peroxidase (APX) gene family in *Camellia sinensis* genome. *Crop Biotechnology*, 14 (2), 19-34. (DOI: [10.30473/cb.2024.71227.1967](https://doi.org/10.30473/cb.2024.71227.1967))

ABSTRACT

Tea is native to East Asia, the Indian subcontinent and Southeast Asia, and its leaves are used as one of the most popular drinks in the world. Environmental stresses are one of the most important factors affecting the quantity and quality of agricultural and garden crops, including tea. One of the prominent effects of environmental stresses on plants is the increase in reactive oxygen species (ROS) production. Ascorbate peroxidase (APX) is a key antioxidant enzyme to inhibit ROS in plants. This study was conducted to identify, study the evolution, function of the APX gene family in tea. To identify APX homologous proteins in the tea genome, protein sequences of the APX family from several monocot and dicot plants were used. BlastP results identified 9 homologous sequences from the APX gene family on different tea scaffolds. Based on phylogenetic relationships, APX gene family proteins in tea and the studied plants, including *Arabidopsis*, rice, maize, and potato, were divided into four distinct evolutionary groups. Due to the relatively equal distribution of genes from monocot and dicot plants in phylogenetic groups, it seems that the evolution of these genes occurred from a common ancestral gene before the divergence of monocot and dicot plants. Investigation of the expression of APX homologous genes in different tissues and various environmental stresses showed that *CsAPX1*, *CsAPX3*, *CsAPX4*, *CsAPX5*, and *CsAPX8* genes had moderate to high expression levels, indicating the importance and key role of these genes in different growth stages and various abiotic stresses in plants.

KEYWORDS

Abiotic stress, Bioinformatics, Evolution, Gene expression, Phylogenetic tree.



مقدمه

چای (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) معروف‌ترین، طعم‌دارترین و یک نوشیدنی غیر الکلی درمانی است که دو سوم جمعیت جهان آن را می‌نوشند. این محصول همیشه سبز در بیش از ۶۰ کشور واقع در پنج قاره جهان کشت می‌شود. ثابت شده است که برگ‌های چای حاوی بسیاری از ترکیبات فعال زیستی از جمله پلی‌فنول‌ها، اسیدهای آمینه، ترکیبات فرار و آلکالوئیدها هستند که همگی دارای پتانسیل خوبی برای کاربردهای زیست پزشکی هستند (Samynathan et al., 2021).

گیاهان به عنوان موجودات غیرمتحرک، باید در محیط‌هایی با تغییرات مداوم زندگی کنند که گاهاً این تغییرات منجر به تنش می‌شود. سیستم بیولوژیکی یک سیستم درون‌زا و پویا است که همیشه به دنبال جریان دائمی انرژی برای حفظ وضعیت متاپایدار خود به نام هموستاز است. هر گونه اختلال محیطی در این هموستاز ممکن است به عنوان تنش بیولوژیکی تعریف شود. مفهوم تنش برای اولین بار توسط "سلی" در سال ۱۹۳۶ به عنوان محدودیت‌های محیطی نامطلوب برای گیاهان تعریف شد (Szabo et al., 2017). تنش در گیاهان به شرایط خارجی اطلاق می‌شود که بر رشد، نمو یا بهره‌وری گیاهان تأثیر منفی می‌گذارد. تنش‌ها باعث ایجاد طیف وسیعی از پاسخ‌های گیاهی مانند تغییر بیان ژن، متابولیسم سلولی، تغییر در نرخ رشد، عملکرد محصول و غیره می‌شوند (Jena et al., 2020).

تنش غیرزیستی به هر عامل محیطی گفته می‌شود که می‌تواند رشد و بهره‌وری گیاه را محدود سازد. از نظر تاریخی، تنش غیرزیستی در نیم قرن گذشته به دلیل رشد سریع جمعیت انسانی (که امنیت غذایی جهانی را تهدید می‌کند) مورد توجه دانشمندان و متخصصان کشاورزی قرار گرفت. افزایش تقاضای مواد غذایی، بررسی دلایل کاهش تولید محصول را اجتناب‌ناپذیر کرد که اغلب نادیده گرفته می‌شد. در همین زمان بود که دانشمندان شروع به تخمین کاهش عملکرد محصولات، ناشی از تنش‌های محیطی و بررسی دلایل آن کردند. در اوایل دهه ۸۰، بوبر تخمین زد که عوامل محیطی ممکن است تولید محصول

را تا ۷۰ درصد کاهش دهد. از آن زمان تاکنون، گزارش‌های متعددی منتشر شده است که به کاهش محصول به دلیل تنش‌های غیرزیستی مختلف اشاره می‌کند. برخی از این تنش‌ها اثرات جبران‌ناپذیری بر زمین‌های تحت کشت و در نهایت بر تولید و کیفیت محصول می‌گذارد (Cramer et al., 2011).

تنش‌های غیرزیستی مانند دمای پایین یا زیاد، کمبود یا بیش بود آب، شوری، فلزات سنگین و تابش فرابنفش، رشد و نمو گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این تنش‌ها، که در مجموع به عنوان تنش‌های غیرزیستی نامیده می‌شوند، تهدیدی جدی برای کشاورزی و اکوسیستم به شمار می‌روند و باعث کاهش عملکرد محصول می‌شوند. گیاهان به دلیل ماهیت ساکن بودنشان باید با تنش‌ها مقابله کنند و تاکتیک‌های انطباقی قوی برای اجتناب یا تحمل اثرات نامطلوب آن‌ها به منظور بقا و رشد ایجاد کنند. در پاسخ به شرایط تنش، مقاومت گیاهان به اشکال مختلف توسط یک شبکه نظارتی پیچیده شامل مولکول‌های سیگنال‌دهنده بالادستی از جمله هورمون‌های تنش، گونه‌های فعال اکسیژن، گازوترنس‌میترها، پلی‌آمین‌ها، فیتوکروم‌ها و کلسیم و همچنین عوامل پایین دست ژن، به ویژه فاکتورهای رونویسی تنظیم می‌شود (He et al., 2018).

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) محصولات جانبی متابولیسم‌های فیزیولوژیکی هستند و دقیقاً توسط سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی کنترل می‌شوند. ROSها به طور قابل توجهی در شرایط تنش غیرزیستی تجمع می‌یابند که باعث آسیب اکسیداتیو و در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود. اخیراً، ROSها نیز به عنوان بازیگران کلیدی در شبکه سیگنالینگ پیچیده پاسخ‌های تنش گیاهان شناخته شده‌اند. شواهد فزاینده‌ای نشان می‌دهد که ROSها نقش مهمی در پاسخ‌های تنش غیرزیستی گیاهان زراعی برای فعال‌سازی مسیرهای واکنش به تنش و دفاع دارد. مهمتر از آن، دستکاری سطوح ROS فرصتی برای افزایش تحمل به تنش گیاهان زراعی در شرایط مختلف محیطی نامطلوب فراهم می‌کند (You and Chan, 2015).

پیشینه پژوهش

در حال حاضر، گزارش های زیادی در مورد اعضای خانواده ژنی APX وجود دارد. خانواده APX در *Arabidopsis thaliana* دارای هشت ژن است که سه ژن *APX1*، *APX2* و *APX6* پروتئین های سیتوپلاسمی، دو ژن *sAPX* و *tAPX* به ترتیب پروتئین های موجود در ماتریکس کلروپلاست و غشای تیلاکوئید و سه ژن *APX4*، *APX5* و *APX6* پروتئین های پراکسیداز را کد می کنند (Panchuk et al., 2002; Narendra et al., 2006). همچنین گزارش های مشابه زیادی در مورد محصولات مانند برنج، گوجه فرنگی، سیب زمینی و پنبه وجود دارد (Leonardis et al., 2000; Lu et al., 2005; Teixeira et al., 2006; Najami et al., 2008; Tao et al., 2018a, b).

لیانگ و همکاران (Liang et al., 2024) خانواده ژنی APX را در گیاه شاهدانه (*Cannabis sativa* L.) تحت تنش های غیرزیستی مختلف مورد تجزیه و تحلیل ژنومی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که سطح بیان ژن های *CsAPX6*، *CsAPX7* و *CsAPX8* تحت چهار تنش سرما، خشکی، شوری و اکسیداتیو افزایش معنی داری داشت. سطح بیان ژن *CsAPX2* تحت تنش خشکی افزایش قابل توجهی در مقایسه با سایر تنش های مورد بررسی از خود نشان داد.

سان و همکاران (Sun et al., 2023) در مطالعه ای روی کلزا (*Brassica napus* L.)، گستره ژنومی و چگونگی بیان ژن های APX را تحت تنش دمای پایین مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان دهنده وجود ۱۸ ژن با سه دامنه حفاظت شده مختلف در کلزا بود که بر اساس تحلیل فیلوژنتیکی به سه شاخه اصلی تقسیم بندی شدند. اکثر ژن های APX به خصوص *APX2*، *APX4*، *APX12* و *APX18* افزایش بیان در سطح رونویسی تحت تنش دمای پایین از خود نشان دادند.

Aleem et al. (2022) خانواده های ژنی APX و CAT را در سویای زراعی و وحشی بررسی کردند. در این مطالعه، به ترتیب ۱۱ و ۱۰ ژن APX در ژنوم سویای زراعی و وحشی شناسایی شد، در حالی که تعداد ژن های

فرآیند سم زدایی ROS در گیاهان برای محافظت از سلول های گیاهی و اندامک های آن ها در برابر اثر سمی این ROS ها ضروری است. تفاوت در مکان یابی درون سلولی و خواص بیوشیمیایی آنزیم های آنتی اکسیدانی و پاسخ های متمایز در بیان ژن، علاوه بر وجود مکانیسم های غیر آنزیمی، منجر به یک سیستم آنتی اکسیدانی همه کاره و انعطاف پذیر نیز می شود که قادر به کنترل سطوح بهینه ROS است. سیستم های سم زدایی ROS شامل اجزای آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی است. آسکوربات (AsA) و گلوتاتیون (GSH)، آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی بسیار مهم برای دفاع گیاه در برابر تنش اکسیداتیو هستند و نقش کلیدی به عنوان بافرهای آنتی اکسیدانی دارند. سایر آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی درگیر شامل فلاونوئیدها، ترکیبات فنلی، آلکالوئیدها، توکوفرول و کاروتنوئیدها هستند. آنتی اکسیدان های آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و پراکسی ردوکسین (PrxR) هستند. این آنزیم ها عملاً در تمام بخش های درون سلولی وجود دارند. معمولاً یک اندامک دارای بیش از یک آنزیم است که قادر به حذف یک ROS است. سیستم اصلی سم زدایی پراکسید هیدروژن در کلروپلاست های گیاهی چرخه آسکوربات-گلوتاتیون است که در آن APX یک آنزیم کلیدی است (Scandalios et al., 2005; Caverzan et al., 2012).

آسکوربات پراکسیداز (APX: Ascorbate peroxidase) یکی از اجزای آنزیمی سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی است. APX ها در اکثر گیاهان عالی شناسایی شده است و شامل خانواده ای از ایزوآنزیم ها با ویژگی های مختلف است. ایزوآنزیم های APX حداقل در چهار جایگاه سلولی مجزا یافت می شوند: APX سیتوزولی (cAPX)، APX متصل به غشای تیلاکوئید در کلروپلاست (tAPX)، APX استروما (sAPX) و APX متصل به غشای میکروبادی، شامل غشای گلی اکسی زوم و پراکسی زوم (mAPX). ایزوفرم های مختلف APX به سیگنال های متابولیکی و محیطی پاسخ متفاوتی می دهند (Gangwar et al., 2014).

چای همچون بسیاری از گیاهان دیگر تحت تاثیر تنش‌های زیستی و به خصوص غیرزیستی قرار دارد. چای معمولاً در اکوسیستم‌های دیم کشت می‌شود و بنابراین با شرایط کمبود آب فصلی مواجه می‌شود که باعث کاهش عملکرد محصول می‌شود. همچنین بسیاری از مناطق تحت کشت چای در معرض فلزات سنگین همچون کادمیوم، مس و آلومینیوم قرار دارند که منجر به کاهش رشد و پاسخ آنتی‌اکسیدانی می‌شوند. تنش‌های غیر زیستی، منجر به افزایش تولید ROSها و تنش اکسیداتیو شده و در نهایت بهره‌وری چای را محدود می‌کند (Upadhyaya and Panda, 2013).

اگرچه مطالعات بسیاری جهت بررسی ساز و کارهای مولکولی و بیوشیمیایی گیاهان مختلف تحت تنش‌های زیستی و غیر زیستی انجام شده است اما همچنان زوایای مختلف آن ناشناخته است. از این رو مطالعه حاضر با هدف شناسایی و مطالعه تکامل و کارکرد خانواده ژنی آسکوربات پراکسیداز (*APX*) در گستره ژنوم گیاه چای (*Camellia sinensis*) انجام شد.

روش شناسی پژوهش

شناسایی ژن‌های همولوگ *APX* در گستره ژنوم چای اطلاعات اولیه و امکان دسترسی به داده‌های ژنومی گیاهان آرآبیدوپسیس تالیانا (*Arabidopsis thaliana*)، برنج - گونه ژاپونیکا (*Oryza sativa- Japonica*)، ذرت (*Zea mays*) و سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) سبب انتخاب آنها برای استخراج توالی‌های پروتئینی خانواده ژنی *APX* به عنوان توالی اولیه جهت شناسایی پروتئین‌های همولوگ در چای شد. اسم ژن‌ها و شماره دسترسی آنها با بررسی منابع قبلی به دست آمد (جدول ۱) و برای دریافت توالی‌های پروتئینی از پایگاه داده EnsemblPlants به نشانی (<https://plants.ensembl.org>) استفاده شد.

توالی پروتئینی خانواده *APX* در آرآبیدوپسیس، برنج، ذرت و سیب‌زمینی به عنوان توالی اولیه با روش BlastP جهت شناسایی پروتئین‌های همولوگ در بانک اطلاعاتی اختصاصی ژنوم چای به نام TeaCoN به نشانی (<http://teacon.wchoda.com/>) Zhang et

CAT شناسایی شده در هر گونه چهار عدد بود. تجزیه و تحلیل تطبیقی فیلوژنتیک همسانی بیشتری را در بین سویای زراعی و وحشی نسبت به سایر حبوبات نشان داد. ساختار اگزون-اینترون و موتیف‌ها در گونه‌های زراعی و وحشی حفاظت شده بودند. با توجه به مقدار Ka/Ks، فشار گزینش منفی عامل اصلی تکامل این خانواده‌های ژنی در سویای وحشی است. در حالی که خانواده ژنی *APX* در سویای زراعی توسط هر دو فشار گزینش مثبت و منفی تکامل یافته است.

Bakir and Yildirim (2022) بیان ژن *LcAPX* را در گیاهچه‌های عدس (*Lens culinaris Medik.*) در شرایط تنش خشکی بررسی کردند. ژن *LcAPX* در هر دو رقم Firat-87 مقاوم و حساس به خشکی با شدت تنش خشکی سطح بیان متفاوتی داشت. این محققین از مطالعه انجام شده به این نتیجه رسیدند که تغییرات وابسته به زمان در بیان ژن *LcAPX* نشان می‌دهد که ژن *LcAPX* دارای مشخصات بیان ژنی بسیار خاص و تنظیم پیچیده در پاسخ به خشکی در عدس است.

Raza et al. (2022) مطالعه جامعی در سطح ژنوم بادام‌زمینی برای کشف ژن‌های *APX* انجام دادند. در این بررسی، ۱۶۶ ژن *AhAPX* در ژنوم بادام‌زمینی شناسایی شد که در ۱۱ گروه اصلی طبقه‌بندی شدند. تجزیه و تحلیل ژن‌های مضاعف شده نشان داد که ژن‌های *AhAPX* دارای مضاعف‌شدگی سگمنتال و فشار گزینش منفی بودند. بررسی ساختار ژن و موتیف‌ها نشان داد که اکثر ژن‌های *AhAPX* یک الگوی اگزون-اینترون نسبتاً حفاظت شده داشتند. بررسی عناصر تنظیمی سیس نیز منجر به شناسایی پنج عنصر تنظیمی مرتبط با هورمون گیاهی، شش عنصر تنظیمی مرتبط با تنش‌های غیر زیستی، و پنج عنصر سیس مرتبط با رشد و توسعه در مناطق پروموتور *AhAPX* شد. همچنین چهارده *ah-miRNA* فرضی از ۱۲ خانواده شناسایی شدند که ۳۳ ژن *AhAPX* را هدف قرار دارند. علاوه بر این، ۳۲۵۷ فاکتور رونویسی را از ۳۸ خانواده (شامل ARF، AP2، B3، bZIP، bHLH، ERF، MYB، NAC، WRKY) و (غیره) در ۱۶۲ ژن *AhAPX* شناسایی شد.

(Artimo et al., 2012). از آن جا که توالی‌یابی ژنوم چای به صورت کامل انجام نشده است، لذا توالی‌ها به شکل اسکافولد (Scaffold) ارائه می‌شود. اطلاعات اسکافولد به همراه محل شروع و پایان ژن به همراه اطلاعات توالی پروتئینی قابل دریافت است. برای پیش‌بینی جایگاه درون سلولی پروتئین‌ها نیز از پایگاه داده CELLO v.2.5 به نشانی (<https://cello.life.nctu.edu.tw/>) استفاده شد (Yu et al., 2014).

رسم درخت فیلوژنتیکی

برای رسم درخت فیلوژنتیکی در ابتدا هم‌مدیف‌سازی پروتئین‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalX یا سایت <https://www.genome.jp/tools-clustalw> به نشانی <https://www.genome.jp/tools-clustalw> انجام شد. سپس درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA7 رسم شد (Kumar et al., 2016). از آنجا که نرم‌افزار MEGA تنها فرمت FASTA را شناسایی می‌کند، لذا از داده‌های ClustalX یا clustalW به شکل FASTA خروجی گرفته شد. برای رسم درخت فیلوژنتیکی از الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه استفاده شد و صحت درخت رسم شده از طریق آزمون Bootstrap ارزیابی شد.

بررسی ساختار اگزونی-اینترونی

جهت تعیین تعداد و طول اگزون‌های خانواده ژنی APX در گستره ژنوم چای و هم‌چنین بررسی فاز اسپیلیسینگ از سایت Gene Structure Display Server (GSDS) به نشانی <http://gsds.gao-lab.org/> استفاده شد (Hu et al., 2015). برای رسم ساختار اگزونی-اینترونی از توالی‌های CDS و DNA ژنومی و هم‌چنین نتیجه حاصل از درخت فیلوژنتیکی که به شکل Newick ذخیره شده بود، استفاده شد.

بررسی پروفایل بیانی ژن‌های APX در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی

جهت بررسی بیان ژن‌های APX در گستره ژنوم چای، از

(al., 2020). پس از دریافت تمام توالی‌ها، توالی‌های تکراری حذف شده و در نهایت تأیید وجود دمین مورد نظر (PF00141) با استفاده از بانک اطلاعاتی SMART به نشانی (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) انجام شد (Letunic et al., 2012). در این پایگاه داده با وارد کردن اطلاعات توالی‌های پروتئینی و انتخاب گزینه PFAM domains، وجود دمین‌های کارکردی موردنظر بررسی شد.

جدول ۱. اسم و شماره دسترسی ژن‌های همولوگ APX در

آرابیدوپسیس، برنج، ذرت و سیب‌زمینی

Table 1. Name and accession number of homologous APX genes in arabidopsis, rice, corn and potato

Accession number	Genes	Plant species
AT1G07890	<i>AtAPX1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (At)
AT3G09640	<i>AtAPX2</i>	
AT4G35000	<i>AtAPX3</i>	
AT4G09010	<i>AtAPX4</i>	
AT4G35970	<i>AtAPX5</i>	
AT4G32320	<i>AtAPX6</i>	
AT4G08390	<i>SAPX</i>	
AT1G77490	<i>TAPX</i>	
OS03G0285700	<i>OsAPX1</i>	<i>Oryza sativa Japonica</i> (Os)
OS07G0694700	<i>OsAPX2</i>	
OS04G0223300	<i>OsAPX3</i>	
OS08G0549100	<i>OsAPX4</i>	
OS12G0178200	<i>OsAPX5</i>	
OS12G0178100	<i>OsAPX6</i>	
OS04G0434800	<i>OsAPX7</i>	
OS02G0553200	<i>OsAPX8</i>	
Zm00001d016802	<i>APXa1</i>	<i>Zea mays</i> (Zm)
Zm00001d003643	<i>APXa2</i>	
Zm00001d023582	<i>APXa3</i>	
Zm00001d025047	<i>APXb1</i>	
Zm00001d053223	<i>APXb2</i>	
Zm00001d047757	<i>APXc1.1</i>	
Zm00001d028709	<i>APXc1.2</i>	
Zm00001d007234	<i>APXc2</i>	
PGSC0003DMG401001731	<i>StAPX2</i>	<i>Solanum tuberosum</i> (St)
PGSC0003DMG400006175	<i>StAPX3</i>	
PGSC0003DMG402003646	<i>StAPX5</i>	
PGSC0003DMG400000894	<i>St2341</i>	
PGSC0003DMG400030056	<i>St7268</i>	
PGSC0003DMG400030063	<i>St7286</i>	
PGSC0003DMG400003645	<i>St9378</i>	

بررسی ویژگی‌های پروتئین‌های APX در گستره

ژنوم چای

ویژگی‌های عمومی پروتئین‌های APX مانند وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک (PI) و تعداد اسیدهای آمینه از سایت Expasy به نشانی (<https://web.expasy.org/protparam/>) دریافت شد

صورت کامل انجام نشده است، لذا محل قرارگیری ژن‌ها به شکل اسکافولد ارائه شد. مرتب‌سازی ژن‌ها بر اساس شماره اسکافولدها انجام شد و برای نامگذاری ژن‌ها ابتدا از حرف اول نام گونه چای (Cs)، در ادامه کلمه *APX* و سپس شماره استفاده شد. به این ترتیب، نامگذاری ژن‌ها از *CsAPX1* شروع و تا *CsAPX9* خاتمه یافت (جدول ۲).

مشخصات عمومی ژن‌های شناسایی شده نشان داد که ژن‌ها به ترتیب روی اسکافولدهای ۲۸۲، ۳۹۹، ۵۶۵، ۲۸۰، ۳۳۶۴، ۳۸۱۵، ۳۹۸۲، ۶۲۵۵ و ۲۴۴۷ قرار داشتند. وزن مولکولی پروتئین‌های شناسایی شده بین ۳۱/۶۵۷ کیلودالتون برای *CsAPX2* تا ۸۴/۱۴۵ کیلودالتون برای *CsAPX3* متغیر بود. کمترین طول پروتئین نیز متعلق به *CsAPX3* و *CsAPX4* با ۲۸ اسیدآمینه و بیشترین طول پروتئین متعلق به *CsAPX2* با ۷۴۵ اسیدآمینه بود. نقطه ایزوالکتریک (pI) نیز بین مقادیر ۵/۰۳ (*CsAPX6*) تا ۹/۱۱ (*CsAPX1*) متغیر بود. محل فعالیت پروتئین‌های *CsAPX3*، *CsAPX4* و *CsAPX9* در سیتوپلاسم، *CsAPX5*، *CsAPX6* و *CsAPX8* در کلروپلاست و *CsAPX2* در غشای پلازما پیش‌بینی شد. برای پروتئین *CsAPX1* دو جایگاه سلولی شامل سیتوپلاسم و میتوکندری پیش‌بینی شد. پیش‌بینی محل فعالیت برای پروتئین *CsAPX7* نیز در دو جایگاه میتوکندری و خارج سلولی بود (جدول ۲).

نتایج بررسی خانواده ژنی *APX* در برنج نشان داد که دارای هشت عضو است که به ترتیب دو ایزوفرم سیتوزولی، دو ایزوفرم پراکسی‌زومی و چهار ایزوفرم کلروپلاستی را کد می‌کنند (Teixeira et al., 2004).

داده‌های RNA-seq مربوط به بافت‌های مختلف گیاه چای شامل جوانه رأسی، گل، میوه، ریشه، ساقه، برگ‌های جوان، بالغ و پیر و در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مختلف شامل شوری، پلی اتیلن گلیکول، سرما و متیل جاسمونات حاصل از پایگاه داده TPIA به نشانی (<http://tpia.teaplant.org/>) استفاده شد (Xia et al., 2019). پایگاه داده TPIA، از داده‌های حاصل از مطالعات شی و همکاران (Shi et al., 2015)، وانگ و همکاران (Wang et al., 2013)، وی و همکاران (Wei et al., 2018) و ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2017) به ترتیب مرتبط با تیمار متیل جاسمونات، تنش سرما، مراحل رشدی و تنش شوری و خشکی تشکیل شده است. نقشه حرارتی (Heat map) بیان ژن‌های *APX* از طریق نرم‌افزار TBtools ترسیم شد (Chen et al., 2018).

یافته‌های پژوهش

شناسایی پروتئین‌های خانواده ژنی *APX* و بررسی

مشخصات عمومی آن‌ها در گستره ژنوم چای

برای شناسایی پروتئین‌های همولوگ در گستره ژنوم چای از توالی‌های پروتئینی خانواده *APX* در تعدادی از گیاهان تک‌لپه و دولپه استفاده شد. از این رو، تعداد هشت توالی پروتئینی از آرآبیدوپسیس، برنج و ذرت و هفت توالی پروتئینی از سیب‌زمینی به عنوان توالی اولیه استفاده شد تا با انجام BlastP، پروتئین‌های همولوگ چای شناسایی شوند. پس از حذف توالی‌های تکراری و تأیید وجود دمین کارکردی مورد نظر، تعداد نه توالی همولوگ از خانواده ژنی *APX* شناسایی شد. از آن جا که توالی‌یابی ژنوم چای به

جدول ۲. مشخصات عمومی ژن‌های خانواده ژنی *APX* در گستره ژنوم چای

Table 2. General characteristics of *APX* genes family members in the tea genome

Cellular localization	Isoelectric point	Protein length(aa)	Weight (Kilo Daltons)	Gene end	Gene start	Scaffold	Gene name	Gene ID
Cytoplasm	9.11	551	61.912	908111	897441	Scaffold282	<i>CsAPX1</i>	TEA026035.1
Mitochondria	6.02	745	84.145	3034087	3016631	Scaffold399	<i>CsAPX2</i>	TEA030817.1
Plasma membrane	6.72	288	31.657	399209	388039	Scaffold565	<i>CsAPX3</i>	TEA000543.1
Cytoplasm	7.06	288	31.895	420631	414081	Scaffold2880	<i>CsAPX4</i>	TEA019211.1
Chloroplast	6.73	421	45.658	685085	678480	Scaffold3364	<i>CsAPX5</i>	TEA012379.1
Chloroplast	5.03	406	44.517	79075	72572	Scaffold3815	<i>CsAPX6</i>	TEA021205.1
Extracellular Mitochondria	6.07	384	41.991	1055211	1048196	Scaffold3982	<i>CsAPX7</i>	TEA018635.1
Chloroplast	5.53	352	38.2	803466	797035	Scaffold6255	<i>CsAPX8</i>	TEA028541.1
Cytoplasm	6.11	450	49.897	647887	641965	Scaffold12447	<i>CsAPX9</i>	TEA017156.1

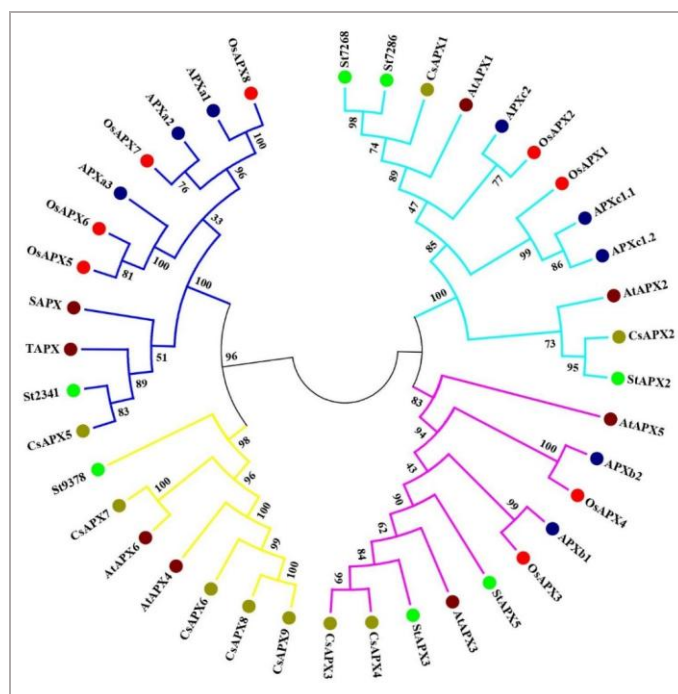
گستره ژنوم چای و سایر گونه‌های گیاهی شامل آراییدوپسیس تالیانا، برنج، ذرت و سیب‌زمینی در شکل یک نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد بر اساس روابط فیلوژنتیکی، پروتئین‌های خانواده ژنی APX در گیاهان مورد مطالعه بر اساس امتیاز بوت استرپ (Felsenstein, 1985) به چهار گروه تکاملی مجزا تقسیم شدند. گروه اول شامل ۱۲ ژن مشتمل بر دو ژن آراییدوپسیس تالیانا، دو ژن برنج، سه ژن ذرت، سه ژن سیب‌زمینی و دو ژن چای بود. گروه دوم از ۱۰ ژن تشکیل شده که شامل دو ژن از آراییدوپسیس تالیانا، دو ژن از برنج، دو ژن از ذرت، دو ژن از سیب‌زمینی و دو ژن از چای است. گروه سوم که از نظر فراوانی ژن‌ها، کوچکترین گروه با کمترین تعداد ژن (هفت عدد) است شامل دو ژن از آراییدوپسیس تالیانا، یک ژن از سیب‌زمینی و چهار ژن چای بود. تعداد ۱۱ ژن در گروه چهارم جای گرفتند که شامل دو ژن آراییدوپسیس تالیانا، چهار ژن برنج، سه ژن ذرت، یک ژن سیب‌زمینی و یک ژن چای بودند (شکل ۱).

خانواده ژنی APX در گیاه گوجه‌فرنگی شامل ژن‌هایی است که سه APX سیتوزولی، دو APX پراکسیزومی و دو APX کلروپلاستی را کد می‌کنند (Najami *et al.*, 2008). همچنین نه عضو از خانواده APX در سورگوم (Akbudak *et al.*, 2018)، به ترتیب ۱۱ و ۱۰ ژن APX در سویای زراعی و وحشی (Aleem *et al.*, 2022)، هشت عضو در آراییدوپسیس (Panchuk *et al.*, 2002; Narendra *et al.*, 2006)، ۱۱ عضو در صنوبر کالیفرنایی (*Populus trichocarpa*) (Leng *et al.*, 2021)، ۱۳ عضو در ژنوم کیوی (رقم: Hongyang) (Liao *et al.*, 2020)، ۲۱ عضو در گندم (Tyagi *et al.*, 2020) و به ترتیب ۱۶ و نه عضو در کلزا، گونه‌های *B. rapa* و *B. juncea* (Verma *et al.*, 2022) شناسایی شده است.

مطالعه فیلوژنتیکی خانواده ژنی APX در چای و

سایر گونه‌های گیاهی

درخت فیلوژنتیکی پروتئین‌های خانواده ژنی APX در



شکل ۱. درخت فیلوژنتیکی پروتئین‌های خانواده ژنی APX در گستره ژنوم چای و سایر گونه‌های گیاهی شامل آراییدوپسیس، برنج، ذرت و سیب‌زمینی

Figure 1. Phylogenetic tree of APX gene family proteins in the tea genome and other plant species including arabidopsis, rice, corn and potato

پروتئین‌ها کد نشده و در مرحله رونویسی pre-mRNA توسط مکانیسم RNA اسپلایسینگ حذف می‌شوند (Zhu *et al.*, 2009).

تعداد اگزون‌های موجود در همولوگ‌های خانواده ژنی APX چای بین نه تا ۱۶ اگزون متغیر بود. کمترین تعداد اگزون به ژن‌های *CsAPX3* و *CsAPX4* با نه اگزون و بیشترین تعداد اگزون به ژن *CsAPX2* با ۱۶ اگزون تعلق داشت. طول اگزون‌ها در گروه سوم که شامل ژن‌های *CsAPX6*، *CsAPX8* و *CsAPX9* بود، از فراوانی تقریباً یکسانی برخوردار است که نشان می‌دهد حفاظت‌شدگی بالایی در ساختار ژنی این گروه فیلوژنتیکی وجود دارد (شکل ۲). Raza *et al.* (2022) در مطالعه‌ای روی ژن‌های APX بادام‌زمینی گزارش کردند که اکثر ژن‌های *AhAPX* یک الگوی اگزون-اینترونی نسبتاً حفاظت‌شده دارند. تعداد اگزون‌ها در خانواده ژنی APX گندم بین هفت تا ۱۲ متغیر بود (Tyagi *et al.*, 2020).

بیشترین تنوع در فراوانی اگزون‌ها در گروه اول مشاهده شد که بیانگر تغییرات تکاملی ژن‌های این گروه فیلوژنتیکی می‌باشد. اتصالات پله‌ای یا زنجیره‌ای (Chaining) ژن‌ها نیز موید این مطلب است که تکامل تدریجی در این ژن‌ها اتفاق افتاده است. شواهد بسیاری نشان می‌دهد که اگزون‌های جدید نیز دائماً به ژنوم‌های در حال تکامل اضافه می‌شوند. مکانیسم‌های متعددی به ایجاد اگزون‌های جدید در ژنوم‌ها، از جمله تکثیر ژنی و مضاعف‌شدگی اگزون‌ها کمک می‌کنند. همچنین اگزون‌زایی (Exonization) نیز یکی از دلایل ایجاد اگزون می‌تواند باشد، جایی که توالی‌های اینترونی به اگزون‌های جدید تبدیل می‌شوند (Sorek, 2007).

نتایج حاصل از بررسی فاز اسپلایسینگ نشان داد که در گروه سوم فیلوژنتیکی (ژن‌های *CsAPX6*، *CsAPX8* و *CsAPX9*) توزیع اینترون‌ها مانند اگزون‌ها، تقریباً یکسان بوده به شکلی که ژن *CsAPX6*، الگوی فازی اسپلایسینگ ۰۰۱۰۰۲۱۱۰۰۰، ژن *CsAPX8*، الگوی فازی اسپلایسینگ ۰۰۱۰۰۲۱۰۰۰ و ژن *CsAPX9*، الگوی فازی اسپلایسینگ ۰۰۱۱۰۰۲۲۱۰۰۰ داشتند. گروه اول همچنان مشابه نتایج حاصل از بررسی توالی اگزونی، تنوع بسیاری در فاز

ژن‌های موجود در گروه‌های اول، سوم و چهارم از همه گیاهان مورد مطالعه شامل برنج، ذرت، آرابیدوپسیس، سیب‌زمینی و چای با فراوانی تقریباً نزدیک به هم بودند. از آنجاکه ذرت و برنج در گروه گیاهان تک‌لپه و آرابیدوپسیس تالیانا، سیب‌زمینی و چای در گروه گیاهان دولپه قرار می‌گیرند؛ لذا قرارگیری تعداد زیادی از ژن‌های مورد بررسی به نسبت تقریباً مساوی در گروه‌های ذکر شده نشان‌دهنده‌ی تکامل این ژن‌ها از یک ژن اجدادی قبل از واگرایی گیاهان تک‌لپه و دولپه می‌باشد (Qu *et al.*, 2020).

ایزوفرم‌های مختلف APX توسط یک فرآیند تکاملی پیچیده که شامل چندین تکرار ژنی است به وجود آمده‌اند. سازماندهی ساختاری ژن‌های APX نیز این فرآیند را منعکس می‌کند و شواهدی برای ارتباط نزدیک بین پروتئین‌های واقع در همان بخش درون سلولی ارائه می‌دهد. به عبارت دیگر محل فعالیت ژن‌های APX نیز در مسیر تکامل آن‌ها اثر می‌گذارد. لذا قرارگیری ژن‌های گیاهان تک‌لپه و دولپه در کنار یکدیگر می‌تواند به دلیل محل فعالیت پروتئین در سلول گیاهی باشد (Teixeira *et al.*, 2004).

ژن‌های موجود در گروه سوم، فقط از گیاهان دولپه شامل آرابیدوپسیس تالیانا، سیب‌زمینی و چای بود و هیچ ژنی از گیاهان تک‌لپه در این گروه قرار نداشت. این موضوع نشان‌دهنده‌ی رابطه تکاملی نزدیک در گیاهان دولپه از نظر هفت ژن موجود در این گروه بود. عوامل بسیاری می‌تواند بر تکامل ژن‌ها اثر بگذارد. از جمله این موارد می‌توان به مضاعف‌شدگی و فشار گزینش اشاره نمود (Shoeva *et al.*, 2017). وجود رابطه نزدیک بین تک‌لپه‌ای‌ها و بین دولپه‌ای‌ها در خانواده‌های ژنی *AGO*، *DCL* و *RDR* نیز در گیاه چای مشاهده شده است (Krishnatreya *et al.*, 2021).

بررسی ساختار اگزونی-اینترونی و فاز اسپلایسینگ خانواده ژنی APX چای

اگزون‌ها و اینترون‌ها، توالی‌های نوکلئوتیدی در DNA و RNA هستند. اگزون‌ها در مسیر رونویسی RNA حفظ می‌شوند، در حالی که اینترون‌ها مستقیماً در رونویسی

اسپلایسینگ از خود نشان دادند. الگوی فاز اسپلایسینگ در اعضای این گروه به شکل ۲۰۰۲۰، ۲۱۰۰۰۲۰، ۲۱۰۰۰۲۰۰۱ و ۲۲۲۲۱۰۲۰۲۱۰۱ بود. الگوی فاز اسپلایسینگ در ژن *CsAPX6* نیز به صورت ۰۱۲۱۱۲۲۲۱۲ بود (شکل ۲).

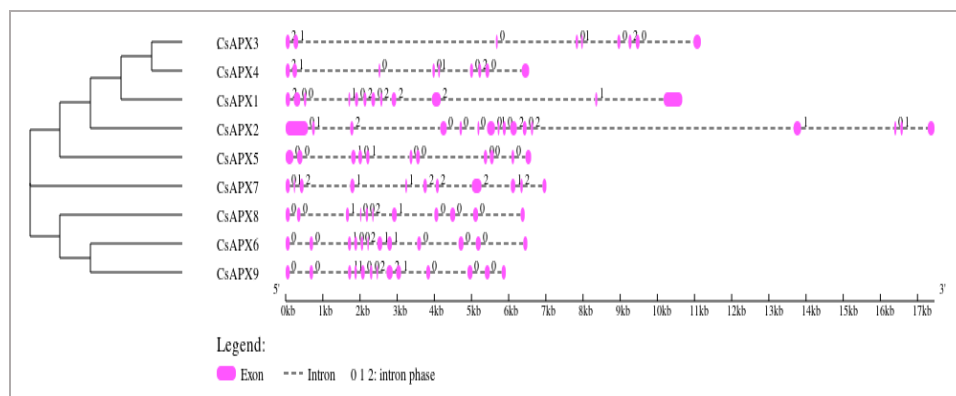
در همه ژن‌های شناسایی شده هر سه فاز اسپلایسینگ صفر، یک و دو وجود داشت. فراوانی سه فاز اسپلایسینگ صفر، یک و دو در مطالعه حاضر به ترتیب معادل ۵۳/۱۹، ۲۴/۴۷ و ۲۲/۳۴ درصد بود. اینترن‌های فاز صفر، یک و دو به ترتیب اینترن‌هایی هستند که قبل از اولین، بعد از اولین و بعد از نوکلئوتید دوم کدون قرار دارند. فاز یک اینترن در طول تکامل حفظ می‌شود، زیرا تغییر در فاز اینترن تنها از طریق جهش‌های همزمان امکان‌پذیر است که انتهای ۵' و ۳' اینترن را به صورت مکمل تغییر می‌دهند. توزیع فازهای اینترن غیر یکنواخت است؛ اینترن‌های فاز صفر بیشترین و اینترن‌های فاز دو کمترین فراوانی را دارند (Fedorov et al., 1992; Long et al., 1998).

دو نظریه در ارتباط با اینترن‌ها وجود دارد. نظریه اول در ارتباط با توزیع غیر یکنواخت اینترن‌ها می‌گوید که ۳۵ درصد از اینترن‌های امروزی قدیمی هستند، یعنی در اجداد وجود داشته‌اند تا هم‌گذاری (Assembly) اولین ژن‌ها را تسهیل کنند. از آن جایی که اگزون‌ها بقایای مینی‌ژن‌های اولیه (Primordial minigenes) هستند، اکثر اینترن‌های قدیمی در فاز صفر قرار می‌گیرند که منجر به افزایش اینترن‌های فاز صفر شده است. با این حال، این نظریه به

طور کاملی توضیح نمی‌دهد که چرا اینترن‌های فاز یک رایج‌تر از اینترن‌های فاز دو هستند (Roy, 2003).

در مقابل، نظریه دوم که نظریه الحاق اینترن (Insertional theory of introns) است پیشنهاد می‌کند که عدم یکنواختی توزیع فاز اینترن ممکن است از الحاق غیر تصادفی اینترن ناشی شده باشد. پیشنهاد شده است که اینترن‌ها فقط در یک الگوی توالی ثابت الحاق شوند که به آن "محل اتصال اولیه" (Proto-splice site) می‌گویند. با این حال، هنوز شواهد روشنی وجود ندارد که توزیع مشاهده شده فاز اینترن ناشی از الحاق اینترن باشد (Dibb and Newman, 1989). افزایش اینترن توسط مکانیسم‌های ناشناخته در نماتدها، قارچ‌ها و تعداد محدودی از موجودات دیگر شناسایی شده است، در حالی که از دست دادن اینترن در بسیاری از موجودات مشاهده شده است (Roy et al., 2003).

بیشترین تعداد اینترن در ژن *CsAPX2* مشاهده شد که به همین دلیل بیشترین طول ژنی را نیز دارا بود. البته این ژن بیشترین تعداد اگزون را نیز داشت. با بررسی خانواده ژنی *APX* در کیوی گزارش شد که *AcAPX*‌ها از چهار الی ۲۲ اینترن تشکیل شده‌اند، با این تفاوت که *AcAPX10* بدون اینترن بود (Liao et al., 2020). در مطالعه دیگری در خانواده ژنی *APX* در ژنوم گندم مشخص شد که در بین تمام ژن‌ها، ۶۰ درصد اینترن در فاز صفر و پس از آن ۲۳ و ۱۷ درصد در فازهای یک و دو قرار داشتند (Tyagi et al., 2020).



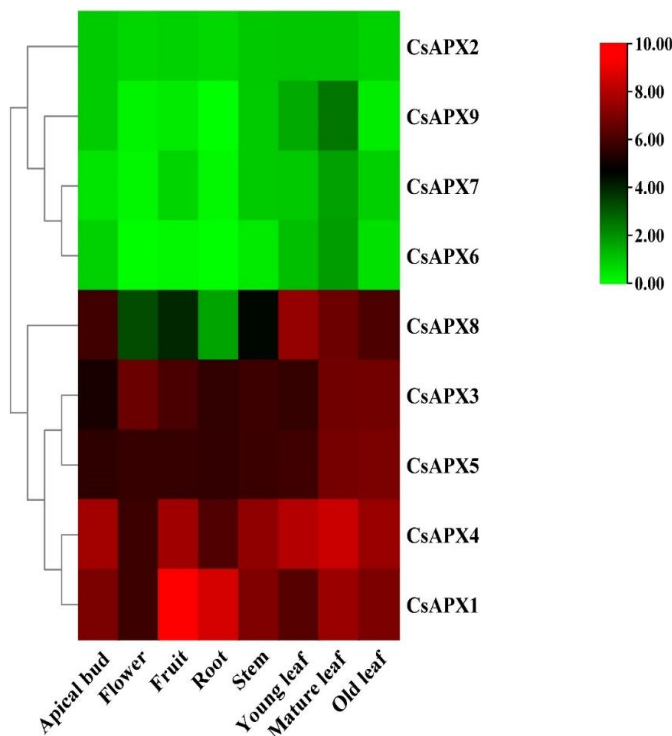
شکل ۲. ساختار اگزونی-اینترونی و فاز اسپلایسینگ در همولوگ‌های خانواده ژنی *APX* در چای
Figure 2. Exon-intron structure and splicing phase of *APX* gene family homologs in tea

انتهایی دارای کمترین میزان بیان بود. تفاوت میزان بیان ژن *CsAPX8* در بافت‌های مختلف گیاهی بسیار متفاوت بود. به گونه‌ای که بیشترین میزان بیان با مقدار ۷/۴۲ در برگ‌های جوان و کمترین میزان بیان با مقدار ۱/۶۹ در ریشه مشاهده شد (شکل ۳).

تقسیم‌بندی بیان ژن‌های شناسایی‌شده همولوگ‌های *APX* در ژنوم چای در تنش‌های مختلف شامل شوری، پلی‌اتیلن گلیکول، سرما و متیل جاسمونات نیز آن‌ها را به دو گروه مجزا تفکیک کرد (شکل ۴). همانند آن چه در بررسی پروفایل بیان ژنی در بافت‌های مختلف گیاهی مشاهده شد، ژن‌های *CsAPX2*، *CsAPX6*، *CsAPX7* و *CsAPX9* دارای میزان بیان کم تا متوسط و ژن‌های *CsAPX1*، *CsAPX3*، *CsAPX4*، *CsAPX5* و *CsAPX8* دارای میزان بیان متوسط تا زیاد بودند. این نتایج نشان‌دهنده نقش کلیدی ژن‌های *CsAPX1*، *CsAPX3*، *CsAPX4*، *CsAPX5* و *CsAPX8* در مراحل مختلف رشدی و تنش‌های مختلف غیرزیستی بودند.

بیان همولوگ‌های ژن *APX* چای

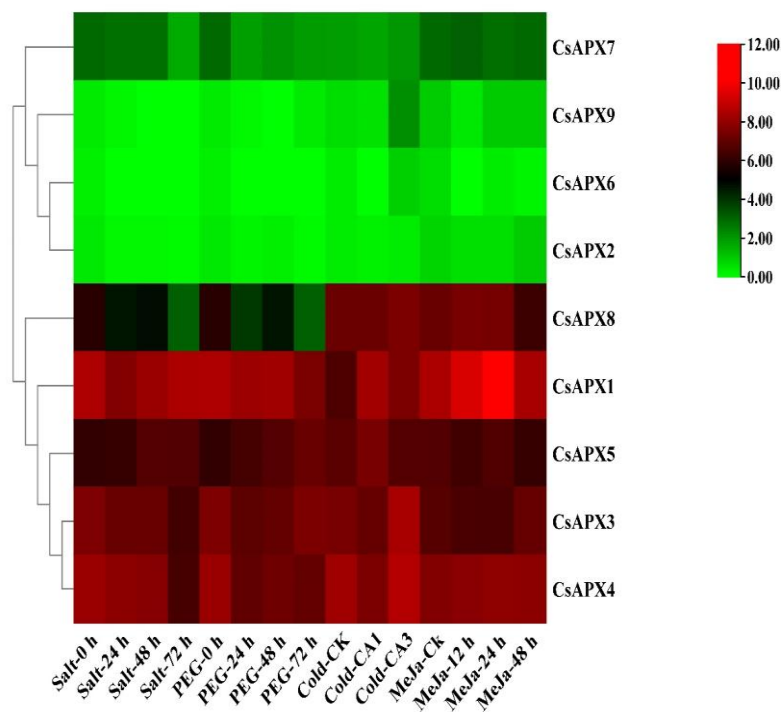
بیان ژن‌های همولوگ *APX* در بافت‌های مختلف چای بررسی شد (شکل ۳). نتایج نشان داد ژن‌های شناسایی‌شده را می‌توان در دو گروه متمایز تفکیک کرد. گروه اول شامل ژن‌های *CsAPX2*، *CsAPX6*، *CsAPX7* و *CsAPX9* بود که میزان بیان آن‌ها در اندام‌های مختلف گیاهی شامل جوانه انتهایی، گل، میوه، ریشه، ساقه، برگ‌های جوان، بالغ و پیر بین مقادیر کم تا متوسط متغیر بود. گروه دوم شامل ژن‌های *CsAPX1*، *CsAPX3*، *CsAPX4*، *CsAPX5* و *CsAPX8* بود که میزان بیان آن‌ها در بافت‌های مختلف گیاهی بین مقادیر متوسط تا زیاد متغیر بود. بیشترین مقدار بیان ژن *CsAPX1* به ترتیب در بافت‌های میوه و ریشه بود. *CsAPX3* در اکثر بافت‌های مورد مطالعه، از میزان بیان تقریباً یکسان برخوردار بود. بیشترین میزان بیان *CsAPX3* و *CsAPX4* به ترتیب در برگ‌های پیر و بالغ مشاهده شد. *CsAPX5* در برگ‌های پیر دارای بیشترین میزان بیان و در جوانه



شکل ۳. الگوی بیان ژن‌های *APX* در بافت‌های مختلف چای. رنگ سبز نشان‌دهنده بیان کم و رنگ قرمز نشان‌دهنده بیان زیاد ژن است.

Figure 3. Expression pattern of *APX* genes in different tea tissues. Green color indicates low expression, red color indicates high expression of the genes.

بیشترین میزان بیان ژن *CsAPX1* ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار متیل جاسمونات بود. سرکوب بیان ژن *CsAPX2* در همه تنش‌های غیرزیستی مورد مطالعه مشاهده شد. بیشترین میزان بیان ژن‌های *CsAPX3*، *CsAPX4* و *CsAPX8* در شرایط تنش سرما CA3 (Cold-acclimated plants for 3 days) و ژن *CsAPX5* در شرایط تنش سرما CA1 (Cold-acclimated plants for 1 days) مشاهده شد. به گونه‌ای که در اکثر تنش‌های مورد بررسی میزان بیان ژن معادل صفر بود. میزان بیان ژن *CsAPX7* بین مقادیر ۱/۶۵ (۷۲ ساعت پس از تنش شوری) و ۳/۱۱ (۱۲ ساعت پس از تیمار متیل جاسمونات) متغیر بود. سرکوب بیان ژن *CsAPX9* در بسیاری از تنش‌های غیرزیستی مشاهده شد. بیان این ژن در شرایط ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تنش شوری و ۴۸ ساعت پس از تیمار پلی اتیلن گلیکول معادل صفر بود (شکل ۴).



شکل ۴. الگوی بیان ژن‌های APX در تنش‌های مختلف غیر زیستی در چای. رنگ سبز نشان‌دهنده بیان کم و رنگ قرمز نشان‌دهنده بیان زیاد ژن است.

Figure 4. Expression pattern of APX genes in different abiotic stresses in tea. Green color indicates low expression and red color indicates high expression of the genes.

گیاهان تک‌لپه و دولپه می‌باشد. البته تعدادی از ژن‌های چای به همراه گیاهان دولپه آراییدوپسیس تالیانا و سیب‌زمینی در گروهی مجزا قرار گرفتند که نشان می‌دهد روابط تکاملی نزدیک بین گیاهان دولپه نیز در تعدادی از ژن‌ها وجود دارد که منجر به تفکیک این ژن‌ها از تک‌لپه‌ای‌ها شده است. تعداد اگزون‌های موجود در پروتئین‌های همولوگ خانواده ژنی *APX* چای بین نه تا ۱۶ اگزون متغیر بود. همچنین تنوع فاز اسپلایسینگ در اعضای گروه‌های فیلوژنتیکی وجود داشت. در همه ژن‌های شناسایی شده هر سه فاز اسپلایسینگ صفر، یک و دو وجود داشت. اینترون‌های فاز صفر بیشترین و اینترون‌های فاز دو کمترین فراوانی را داشتند. بررسی بیان ژن‌های شناسایی شده همولوگ *APX* در ژنوم چای در بافت‌های مختلف گیاهی شامل جوانه رأسی، گل، میوه، ریشه، ساقه، برگ‌های جوان، بالغ و پیر و تنش‌های مختلف محیطی شامل شوری، پلی‌اتیلن گلیکول، سرما و متیل جاسمونات آن‌ها را به دو گروه مجزا تفکیک کرد. در هر دو پروفایل بیانی، ژن‌های *CsAX2*، *CsAPX6*، *CsAPX7* و *CsAPX9* دارای میزان بیان کم تا متوسط و ژن‌های *CsAPX1*، *CsAPX3*، *CsAPX4*، *CsAPX5* و *CsAPX8* دارای میزان بیان متوسط تا زیاد بودند. این نتایج نشان‌دهنده نقش کلیدی ژن‌های *CsAPX1*، *CsAPX3*، *CsAPX4*، *CsAPX5* و *CsAPX8* در مراحل مختلف رشدی و تنش‌های مختلف غیرزیستی بودند. این مطالعه، یک گام ابتدایی در مسیر درک فعالیت ژن‌های *APX* چای بوده و در مطالعات آتی، این یافته‌ها جهت بررسی نقش اختصاصی این ژن‌ها در شرایط تنش، مراحل مختلف رشدی و متابولیسم ترکیبات زیستی کارآمد خواهد بود.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

References

Akbudak, M. A., Filiz, E., Vatansever, R., & Kontbay, K. (2018). Genome-wide identification and expression profiling of ascorbate peroxidase (APX) and glutathione peroxidase (GPX) genes

نتایج این مطالعه نشان داد الگوی بیان ژن‌های *APX* در چای، شباهت‌ها و تفاوت‌هایی با سایر گیاهان دارد که ممکن است به دلیل تفاوت ماهیت ژنتیکی گونه‌ها و مکانیسم‌های تنظیمی مختلف باشد.

تنظیم بیان ژن‌های *APX* در پاسخ به تنش‌های محیطی نشان‌دهنده اهمیت بالای این ژن‌ها در حفاظت گیاهان در برابر تنش‌های محیطی است. افزایش بیان ژن‌های *APX* می‌تواند با کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از تنش‌های محیطی به بقای گیاه کمک کند. این ژن‌ها نقش مهمی در مدیریت رادیکال‌های آزاد و حفظ تعادل اکسیداتیو-احیای در سلول‌ها دارند که برای بقای گیاه تحت شرایط تنش ضروری است. مکانیسم‌های مولکولی منجر به تنظیم بیان ژن‌های *APX* در چای هنوز به طور کامل مشخص نشده است، بنابراین یافته‌های این مطالعه می‌تواند گوشه‌ای از زوایای ناشناخته تنظیم این ژن را آشکار کند و به برنامه‌ریزی محققین برای افزایش تحمل گیاه چای در برابر تنش‌های محیطی می‌تواند کمک موثر کند. استفاده از روش‌های اصلاح سنتی و مولکولی با تاکید بر افزایش بیان ژن‌های *APX* احتمالاً می‌تواند به افزایش تحمل گیاهان از جمله چای در برابر تنش‌های محیطی منجر شود. به عنوان نمونه استفاده از موادی مانند متیل جاسمونات یا اسید سالیسیلیک که باعث افزایش بیان ژن‌های *APX* می‌شود، می‌تواند به عنوان یک استراتژی مدیریتی برای کاهش خسارات ناشی از تنش‌های محیطی در کشاورزی مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

بر اساس روابط فیلوژنتیکی، پروتئین‌های خانواده ژنی *APX* در گیاهان مورد مطالعه به چهار گروه تکاملی مجزا تقسیم شدند. قرارگیری گیاهان تک‌لپه و دولپه به نسبت تقریباً مساوی در دو گروه تکاملی نشان‌دهنده تکامل این ژن‌ها از یک ژن اجدادی قبل از واگرایی

under drought stress in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 37, 925-936. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9788-9>.

- Aleem, M., Aleem, S., Sharif, I., Aleem, M., Shahzad, R., Khan, M. I., Batool, A., Sarwar, G., Farooq, J., Iqbal, A., Jan, B. L., Kaushik, P., Feng, X., Bhat, J. A., & Ahmad, P. (2022). Whole-genome identification of APX and CAT gene families in cultivated and wild soybeans and their regulatory function in plant development and stress response, *Antioxidants*, *11*, 1626. <https://doi.org/10.3390/antiox11081626>.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., De Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., & Grosdidier, A. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research*, *40* (W1), W597-W603. <https://doi.org/10.1093/nar/gks400>.
- Bakir, M., & Yildirim, C. (2022). Isolation of ascorbate peroxidase (APX) gene in lentil (*Lens culinaris* Medik.) and expression analysis under drought stress conditions. *Ege Universitesi Ziraat Fakultesi Dergisi*, *59* (3), 439-447. <https://doi.org/10.20289/zfdergi.1007041>
- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F., & Margis-Pinheiro, M. (2012). Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, *35* (4), 1011-1019. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572012000600016>.
- Chen, C., Chen, H., He, Y., & Xia, R. (2018). TBtools, a toolkit for biologists integrating various biological data handling tools with a user-friendly interface. *bioRxiv*, 289660. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2020.06.009>.
- Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., & Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: A systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, *11*, 163. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-163>.
- Dibb, N. J., & Newman, A. J. (1989). Evidence that introns arose at proto-splice sites. *EMBO Journal*, *8*, 2015-2021. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03609.x>.
- Fedorov, A., Suboch, G., Bujakov, M., & Fedorova, L. (1992). Analysis of nonuniformity in intron phase distribution. *Nucleic Acids Research*, *20*, 2553-2557. <https://doi.org/10.1093/nar/20.10.2553>.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, *39* (4), 783-791. <https://doi.org/10.2307/2408678>.
- Filiz, E., Ozyigit, I. I., Saracoglu, I. A., Uras, M. E., Sen, U., & Yalcin, B. (2019). Abiotic stress-induced regulation of antioxidant genes in different *Arabidopsis* ecotypes: microarray data evaluation. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, *33* (1), 128-143. <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1556120>
- Gangwar, S., Singh, V. P., Tripathi, D. K., Chauhan, D. K., Prasad, S. M., & Maurya, J. N. (2014). Plant responses to metal stress: the emerging role of plant growth hormones in toxicity alleviation. In: Ahmad, P., & Rasool, S (Eds.). *Emerging technologies and management of crop stress tolerance*. Academic Press, 215-248. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800875-1.00010-7>.
- He, M., He, C. Q., & Ding, N. Z. (2018). Abiotic stresses: general defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1771. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01771>.
- Jena, J., Sahoo, S. K & Dash, G. K. (2020). An introduction to abiotic stress in plants. In: *Advances in agronomy*. 9, 163-186, AkiNik Publications, New Delhi. <https://doi.org/10.22271/ed.book.725>.
- Krishnatreya, D. B., Baruah, P. M., Dowarah, B., Chowrasia, S., Mondal, T. K., & Agarwala, N. (2021). Genome-wide identification, evolutionary relationship and expression analysis of *AGO*, *DCL* and *RDR* family genes in tea. *Scientific Reports*, *11*, 8679. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87991-5>.
- Kumar, S., Stecher G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33* (7), 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Leng, X., Wang, H., Zhang, S., Qu, C., Yang, C., Xu, Z., & Liu, G. (2021). Identification and characterization of the APX gene family and its expression pattern under phytohormone treatment and abiotic stress in *Populus trichocarpa*. *Genes*, *12* (3), 334. <https://doi.org/10.3390/genes12030334>.
- Leonardis, S. D., Dipierro, N., & Dipierro, S. (2000). Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry*, *38* (10), 773-779. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)01188-8](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)01188-8).
- Letunic, I., Doerks, T., & Bork, P. (2012). SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research*, *40* (D1), D302-D305. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr931>.
- Liao, G. L., Liu, Q., Li, Y. Q., Zhong, M., Huang, C. H., Jia, D. F., & Xu, X. B. (2020). Identification

- and expression profiling analysis of ascorbate peroxidase gene family in *Actinidia chinensis* (Hongyang). *Journal of Plant Research*, 133 (5), 715-726. <https://doi.org/10.1007/s10265-020-01206-y>.
- Long, M., de Souza, S. J., Rosenberg, C., & Gilbert, W. (1998). Relationship between proto-splice sites and intron phases: evidence from dicodon analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95, 219-223. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.219>.
- Lu, Z., Takano, T., & Liu, S. (2005). Purification and characterization of two ascorbate peroxidases of rice (*Oryza sativa* L.) expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 27 (1), 63-67. <https://doi.org/10.1007/s10529-004-6587-0>.
- Najami, N., Janda, T. Barriah, W. Kayam, G. Tal, M. Guy M., & Volokita. M. (2008). Ascorbate peroxidase gene family in tomato: its identification and characterization. *Molecular Genetics and Genomics*, 279, 171-182. <https://doi.org/10.1007/s00438-007-0305-2>.
- Narendra, S., Venkataramani, S., Shen, G. X., Wang, J., Pasapula, V., Lin, Y., Korniyev, D., Holaday, A. S., & Zhang, H. (2006). The *Arabidopsis* ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for *Arabidopsis* growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 57, 3033-3042. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl060>.
- Panchuk, I. I., Volkov R. A., & Schoeffl. F. (2002). Heat stress and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129, 838-853. <https://doi.org/10.1104/pp.001362>.
- Qu, C., Wang, L., Zhao, Y., & Liu, C. (2020). Molecular evolution of maize ascorbate peroxidase genes and their functional divergence. *Genes (Basel)*, 11 (10), 1204. <https://doi.org/10.3390/genes11101204>.
- Raza, A., Sharif, Y., Chen, K., Wang, L., Fu, H., Zhuang, Y., Chitiki, A., Chen, H., Zhang, C., Varshney, R. K., & Zhuang, W. (2022). Genome-wide characterization of ascorbate peroxidase gene family in peanut (*Arachis hypogea* L.) revealed their crucial role in growth and multiple stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 13, 962182. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.962182>.
- Roy, S. W. (2003). Recent evidence for the exon theory of genes. *Genetica*, 118, 251-266. <https://doi.org/10.1023/A:1024190617462>.
- Roy, S. W., Fedorov, A., & Gilbert, W. (2003). Large-scale comparison of intron positions in mammalian genes shows intron loss but no gain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100, 7158-7162. <https://doi.org/10.1073/pnas.1232297100>.
- Samynathan, R., Shanmugam, K., Nagarajan, C., Murugasamy, H., Ilango, R. V. J., Shanmugam, A., Venkidasamy, B., & Thiruvengadam, M. (2021). The effect of abiotic and biotic stresses on the production of bioactive compounds in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Plant Gene*, 27, 100316. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2021.100316>.
- Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 995-1014. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005000700003>.
- Szabo, S., Yoshida, M., Filakovszky, J., & Juhasz, G. (2017). "Stress" is 80 years old: from Hans Selye original paper in 1936 to recent advances in GI ulceration. *Current Pharmaceutical Design*, 23 (27), 4029-4041. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170622110046>.
- Shi, J., Ma, C., Qi, D., Lv, H., Yang, T., Peng, Q., Chen, Z., & Lin, Z. (2015). Transcriptional responses and flavor volatiles biosynthesis in methyl jasmonate-treated tea leaves. *BMC Plant Biology*, 15, 233. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0609-z>.
- Shoeva, O. Y., Glagoleva, A. Y., & Khlestkina, E. K. (2017). The factors affecting the evolution of the anthocyanin biosynthesis pathway genes in monocot and dicot plant species. *BMC Plant Biology*, 17 (Suppl 2), 256. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1190-4>.
- Sorek, R. (2007). The birth of new exons: mechanisms and evolutionary consequences. *RNA*, 13 (10), 1603-1608. <https://doi.org/10.1261/rna.682507>.
- Tao, C. C., Jin, X., Zhu, L. P., Xie, Q. L., Wang, X. C., & Li, H. B. (2018a). Genome-wide investigation and expression profiling of APX gene family in *Gossypium hirsutum* provide new insights in redox homeostasis maintenance during different fiber development stages. *Molecular Genetics and Genomics*, 293, 685-697. <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1413-2>.
- Tao, J. J., Wu, H., Li, Z. Y., Huang, C. H., & Xu, X. B. (2018b). Molecular evolution of GDP-d-mannose epimerase (GME) a key gene in plant ascorbic acid biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1293. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01293>.
- Teixeira, F. K., Menezes, B. L., Galvão, V. C., Margis R., & Margis, P. M. (2006). Rice ascorbate peroxidase gene family encodes

- functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta*, 224, 300-314. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0214-8>.
- Teixeira, F. K., Menezes-Benavente, L., Margis, R., & Margis-Pinheiro, M. (2004). Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome. *Journal of Molecular Evolution*, 59 (6), 761-770. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-2666-z>.
- Tyagi, S., Shumayla, P. C. Verma, Singh, K., & Upadhyay, S. K. (2020). Molecular characterization of ascorbate peroxidase (APX) and APX-related (APX-R) genes in *Triticum aestivum* L. *Genomics*, 112, 4208-4223. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.07.023>.
- Upadhyaya, H., & Panda, S. K. (2013). Abiotic stress responses in tea [*Camellia sinensis* L. (o) Kuntze]: an overview. *Reviews in Agricultural Science*, 1, 1-10. <https://doi.org/10.7831/ras.1.1>.
- Verma, D., Upadhyay, S. K., & Singh, K. (2022). Characterization of APX and APX-R gene family in *Brassica juncea* and *B. rapa* for tolerance against abiotic stresses. *Plant Cell Reports*, 41, 571-592. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02726-0>
- Wang, X. C., Zhao, Q. Y., Ma, C. L., Zhang, Z. H., Cao, H. L., Kong, Y. M., Yue, C., Hao, X. Y., Chen, L., Ma, J. Q., Jin, J. Q., Li, X., & Yang, Y. J. (2013). Global transcriptome profiles of *Camellia sinensis* during cold acclimation. *BMC Genomics*, 14, 415. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-415>.
- Wei, C., Yang, H., Wang, S., Zhao, J., Liu, C., Gao, L., Xia, E., et al. (2018). Draft genome sequence of *Camellia sinensis* var. *sinensis* provides insights into the evolution of the tea genome and tea quality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 115 (18), E4151-E4158. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719622115>.
- Xia, E. H., Li, F. D., Tong, W., Li, P. H., Wu, Q., Zhao, H. J., Ge, R. H., Li, R. P., Li, Y. Y., Zhang, Z. Z., Wei, C. L., & Wan, X. C. (2019). Tea plant information archive: a comprehensive genomics and bioinformatics platform for tea plant. *Plant Biotechnology Journal*, 17 (10), 1938-1953. <https://doi.org/10.1111/pbi.13111>.
- You, J., & Chan, Z. (2015). ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1092. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01092>.
- Yu, C. S., Cheng, C. W., Su, W. C., Chang, K. C., Huang, S. W., Hwang, J. K., & Lu, C. H. (2014). CELLO2GO: a web server for protein subCELLular LOcalization prediction with functional gene ontology annotation. *PLoS One*, 9 (6), e99368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099368>.
- Zhang, R., Ma, Y., Hu, X., Chen, Y., He, X., Wang, P., Chen, Q., Ho, C. T., Wan, X., Zhang, Y., & Zhang, S. (2020). TeaCoN: A database of gene co-expression network for tea plant (*Camellia sinensis*). *BMC genomics*, 21, 461. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06839-w>.
- Zhu, L., Zhang, Y., Zhang, W., Yang, S., Chen, J. Q., & Tian, D. (2009). Patterns of exon-intron architecture variation of genes in eukaryotic genomes. *BMC Genomics*, 10, 47. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-47>
- Zhang, Q., Cai, M., Yu, X., Wang, L., Guo, C., Ming, R., & Zhang, J. (2017). Transcriptome dynamics of *Camellia sinensis* in response to continuous salinity and drought stress. *Tree Genetics and Genomes*, 13, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s11295-017-1161-9>.