Crop Biotechnology Open Access

Winter (2024) 14 (2): 19-34.
DOI: 10.30473/cb.2024.71227.1967

ORIGINAL ARTICLE

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

Nahid Azami[1], Ali Aalami[1(ORCID: 0000-0002-6791-833X)], Amin Abedi[1]

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

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.

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)

© 2024, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).
https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/

زیست‌فناوری گیاهان زراعی

سال چهاردهم، شماره دوم، پیاپی ۴۸، زمستان ۱۴۰۳ (۳۴-۱۹)
DOI: 10.30473/cb.2024.71227.1967

«مقاله پژوهشی»

بررسی بیوانفورماتیکی اعضای خانواده ژنی آسکوربات پراکسیداز (APX) در گستره ژنوم *Camellia sinensis*

ناهید اعظمی[۱]، علی اعلمی[۱](ارکید: ۰۰۰۰۰۰۰۲۶۷۹۱۸۳۳X)، امین عابدی[۱]

۱. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

نویسنده مسئول:
علی اعلمی
رایانامه: ali_aalami@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۱۱

چکیده

چای بومی شرق آسیا، شبه قاره هند و آسیای جنوب شرقی است که برگ‌های آن پس از فراوری به عنوان یکی از محبوب‌ترین نوشیدنی‌های جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. تنش‌های محیطی از مهم ترین عوامل اثر گذار بر کمیت و کیفیت محصولات زراعی و باغی از جمله چای می‌باشند. یکی از بارزترین اثرات تنش‌های محیطی در گیاهان، افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) است که می‌تواند اثر مخربی بر فعالیت‌های سلولی داشته باشد. آسکوربات پراکسیداز (APX) یک آنزیم آنتی‌اکسیدان کلیدی جهت مهار ROS ها در گیاهان می‌باشد. در این مطالعه برای شناسایی پروتئین‌های همولوگ APX در گستره ژنوم چای از توالی‌های پروتئینی خانواده APX در تعدادی از گیاهان تک‌لپه و دولپه استفاده شد. نتایج BlastP توانست نه توالی همولوگ از خانواده ژنی *APX* روی اسکافولدهای مختلف چای را شناسایی کند. بر اساس روابط فیلوژنتیکی، پروتئین‌های خانواده ژنی *APX* در چای و گیاهان مورد مطالعه شامل آرابیدوپسیس، برنج، ذرت و سیب‌زمینی بر اساس امتیاز بوت استرپ به چهار گروه تکاملی مجزا تقسیم شدند. به دلیل قرارگیری ژن‌های گیاهان دولپه و تک‌لپه به نسبت تقریباً مساوی در گروه‌های فیلوژنتیکی، به نظر می‌رسد تکامل این ژن‌ها از یک ژن اجدادی قبل از واگرایی گیاهان تک‌لپه و دولپه صورت گرفته است. بررسی بیان ژن‌های همولوگ *APX* در بافت‌های مختلف گیاهی و تنش‌های متفاوت محیطی نشان داد که ژن‌های *CsAPX1*، *CsAPX3*، *CsAPX4*، *CsAPX5* و *CsAPX8* دارای میزان بیان متوسط تا زیاد بودند که نشان‌دهنده اهمیت و نقش کلیدی این ژن‌ها در مراحل مختلف رشدی و تنش‌های محیطی بود.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن، بیوانفورماتیک، تکامل، تنش غیرزیستی، درخت فیلوژنتیکی.

استناد به این مقاله:

اعظمی، ناهید؛ اعلمی، علی و عابدی، امین (۱۴۰۳). بررسی بیوانفورماتیکی اعضای خانواده ژنی آسکوربات پراکسیداز (APX) در گستره ژنوم *Camellia sinensis*. *فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی*، ۱۴ (۲)، ۳۴-۱۹.
(DOI: 10.30473/cb.2024.71227.1967)

حق انتشار این مستند، متعلق به نویسندگان آن است. ۱۴۰۳ ©. ناشر این مقاله، دانشگاه پیام نور است.

این مقاله تحت مجوز Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) منتشر شده و استفاده از آن با ارجاع صحیح مجاز است.
(http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

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 می کند) مورد توجه دانشمندان و متخصصان کشاورزی قرار گرفت. افزایش تقاضای مواد غذایی، بررسی دلایل کاهش تولید محصول را اجتناب‌ناپذیر کرد که اغلب نادیده گرفته می شد. 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، بویر 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 تنش های غیرزیستی مختلف اشاره می‌کند. برخی از این تنش‌ها اثرات جبران ناپذیری بر زمین های 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 بقاء 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 پایین‌دست 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. اخیرا، 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).

فرآیند سم زدایی ROS در گیاهان برای محافظت از سلول‌های گیاهی و اندامک‌های آن‌ها در برابر اثر سمی این ROSها ضروری است. تفاوت در مکان‌یابی درون سلولی و خواص بیوشیمیایی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پاسخ‌های متمایز در بیان ژن، علاوه بر وجود مکانیسم‌های غیر آنزیمی، منجر به یک سیستم آنتی اکسیدانی همه کاره و انعطاف‌پذیر نیز می‌شود که قادر به کنترل سطوح بهینه ROS است. سیستم‌های سم‌زدایی ROS شامل اجزای آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی است. آسکوربات (AsA) و گلوتاتیون (GSH)، آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی بسیار مهم برای دفاع گیاه در برابر تنش اکسیداتیو هستند و نقش کلیدی به عنوان بافرهای آنتی اکسیدانی دارند. سایر آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی درگیر شامل فلاونوئیدها، ترکیبات فنلی، آلکالوئیدها، توکوفرول و کاروتنوئیدها هستند. آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD) ، آسکوربات پراکسیداز (APX) ، کاتالاز (CAT) ، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و پراکسی ردوکسین (PrxR) هستند. این آنزیم ها عملاً در تمام بخش‌های درون سلولی وجود دارند. معمولاً یک اندامک دارای بیش از یک آنزیم است که قادر به حذف یک ROS است. سیستم اصلی سم‌زدایی پراکسید هیدروژن در کلروپلاست‌های 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 آنتی‌اکسیدانی است. APXها در اکثر گیاهان عالی شناسایی شده است و شامل خانواده‌ای از ایزوآنزیم‌ها با ویژگی‌های مختلف است. ایزوآنزیم‌های APX حداقل در چهار جایگاه سلولی مجزا یافت می‌شوند: APX سیتوزولی (cAPX)، APX متصل به غشای تیلاکوئید در کلروپلاست (tAPX)، APX استروما (sAPX) و APX متصل به غشای میکروبادی، شامل غشای گلی‌اکسی‌زوم و پراکسی‌زوم (mAPX). ایزوفرم‌های مختلف APX به سیگنال‌های متابولیکی و محیطی پاسخ متفاوتی می‌دهند (Gangwar *et al.*, 2014).

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* پروتئین‌های سیتوپلاسمی، دو ژن *sAPX* و *tAPX* به ترتیب پروتئین‌های موجود در ماتریکس کلروپلاست و غشای تیلاکوئید و سه ژن *APX4*، *APX5* و *APX6*، پروتئین‌های پراکسیداز را کد می‌کنند (Panchuk *et al.*, 2002; Narendra *et al.*, 2006). هم‌چنین گزارش‌های مشابه زیادی در مورد محصولاتی مانند برنج، گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی 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 تنش‌های غیرزیستی مختلف مورد تجزیه و تحلیل ژنومی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که سطح بیان ژن‌های *CsAPX6*، *CsAPX7* و *CsAPX8* تحت چهار تنش سرما، خشکی، شوری و اکسیداتیو افزایش معنی‌داری داشت. سطح بیان ژن *CsAPX2* تحت تنش خشکی افزایش قابل توجهی در مقایسه با سایر تنش‌های مورد بررسی از خود نشان داد.

سان و همکاران (Sun *et al.*, 2023) در مطالعه‌ای روی کلزا (*Brassica napus* L.)، گستره ژنومی و چگونگی بیان ژن‌های *APX* را تحت تنش دمای پایین مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان‌دهنده وجود ۱۸ ژن با سه دامنه حفاظت‌شده مختلف در کلزا بود که بر اساس تحلیل فیلوژنتیکی به سه شاخه اصلی تقسیم‌بندی شدند. اکثر ژن‌های *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) خانواده‌های 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 ژن‌های

CAT شناسایی‌شده 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 حفاظت‌شده 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 انجام‌شده 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 مضاعف‌شده 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 حفاظت‌شده 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 پروموتر *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 AP2، ARF، B3، bHLH، bZIP، ERF، MYB، NAC، WRKY، و غیره) در ۱۶۲ ژن *AhAPX* شناسایی شد.

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.

روش‌شناسی پژوهش

شناسایی ژن‌های همولوگ APX در گستره ژنوم چای

اطلاعات اولیه و امکان دسترسی به داده های ژنومی گیاهان آرابیدوپسیس 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 آرابیدوپسیس، 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/ استفاده شد (Zhang *et*

al., 2020). پس از دریافت تمام توالی‌ها، توالی‌های تکراری حذف شده و در نهایت تائید 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	*AtAPX1*	*Arabidopsis thaliana* (At)
AT3G09640	*AtAPX2*	
AT4G35000	*AtAPX3*	
AT4G09010	*AtAPX4*	
AT4G35970	*AtAPX5*	
AT4G32320	*AtAPX6*	
AT4G08390	*SAPX*	
AT1G77490	*TAPX*	
OS03G0285700	*OsAPX1*	*Oryza sativa Japonica* (Os)
OS07G0694700	*OsAPX2*	
OS04G0223300	*OsAPX3*	
OS08G0549100	*OsAPX4*	
OS12G0178200	*OsAPX5*	
OS12G0178100	*OsAPX6*	
OS04G0434800	*OsAPX7*	
OS02G0553200	*OsAPX8*	
Zm00001d016802	*APXa1*	*Zea mays* (Zm)
Zm00001d003643	*APXa2*	
Zm00001d023582	*APXa3*	
Zm00001d025047	*APXb1*	
Zm00001d053223	*APXb2*	
Zm00001d047757	*APXc1.1*	
Zm00001d028709	*APXc1.2*	
Zm00001d007234	*APXc2*	
PGSC0003DMG401001731	*StAPX2*	*Solanum tuberosum* (St)
PGSC0003DMG400006175	*StAPX3*	
PGSC0003DMG402003646	*StAPX5*	
PGSC0003DMG400000894	*St2341*	
PGSC0003DMG400030056	*St7268*	
PGSC0003DMG400030063	*St7286*	
PGSC0003DMG400003645	*St9378*	

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 (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 همردیف‌سازی پروتئین‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalX یا سایت clustalW به نشانی https://www.genome.jp/tools-bin/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 اسپلایسینگ 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

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 آرابیدوپسیس، 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 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 شناسایی‌شده نشان داد که ژن‌ها به ترتیب روی اسکافولدهای ۲۸۲، ۳۹۹، ۵۶۵، ۲۸۸۰، ۳۳۶۴، ۳۸۱۵، ۳۹۸۲، ۶۲۵۵ و ۲۴۴۷ قرار داشتند. وزن مولکولی پروتئین های شناسایی‌شده بین ۳۱/۶۵۷ کیلودالتون برای CsAPX3 تا ۸۴/۱۴۵ کیلودالتون برای CsAPX2 متغیر بود. کمترین طول پروتئین نیز متعلق به CsAPX3 و CsAPX4 با ۲۸۸ 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 پلاسما 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).

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

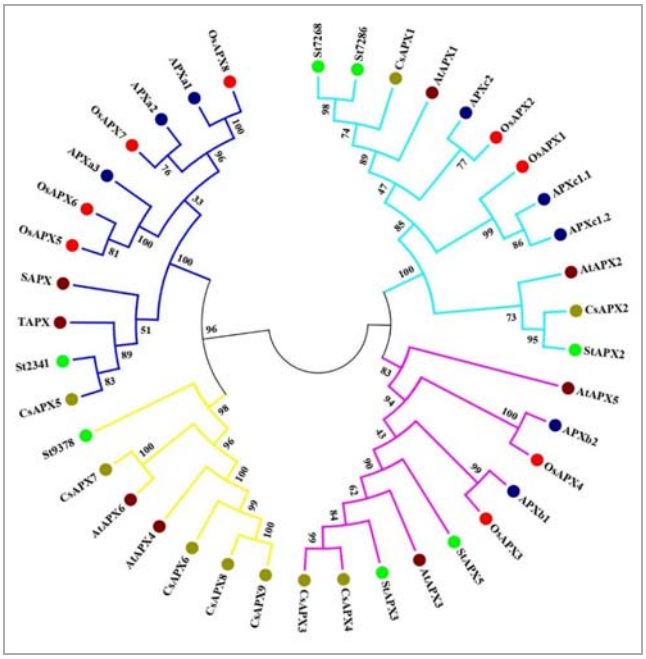
Table 2. General characteristics of *APX* genes family members in the tea genome

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

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 آرابیدوپسیس (Panchuk *et al*, 2002; Narendra *et al*, 2006)، ۱۱ عضو در صنوبر کالیفرنیایی (*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. juncea* و *B. rapa* (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 گستره ژنوم چای و سایر گونه‌های گیاهی شامل آرابیدوپسیس 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 آرابیدوپسیس 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 آرابیدوپسیس 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 آرابیدوپسیس تالیانا، یک ژن از سیب‌زمینی و چهار ژن چای بود. تعداد ۱۱ ژن در گروه چهارم جای گرفتند که شامل دو ژن آرابیدوپسیس تالیانا، چهار ژن برنج، سه ژن ذرت، یک ژن سیب‌زمینی و یک ژن چای بودند (شکل ۱).



شکل ۱. درخت فیلوژنتیکی پروتئین‌های خانواده ژنی *APX* در گستره ژنوم چای و سایر گونه‌های گیاهی شامل آرابیدوپسیس، 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

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

تعداد اگزون‌های موجود در همولوگ های 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 اسپلایسنگ ۰۰۱۰۰۲۱۰۰۰ و ژن *CsAPX9*، الگوی فازی اسپلایسینگ ۰۰۱۱۰۰۲۲۱۰۰۰ داشتند. گروه اول همچنان مشابه نتایج حاصل از بررسی توالی اگزونی، تنوع بسیاری در فاز

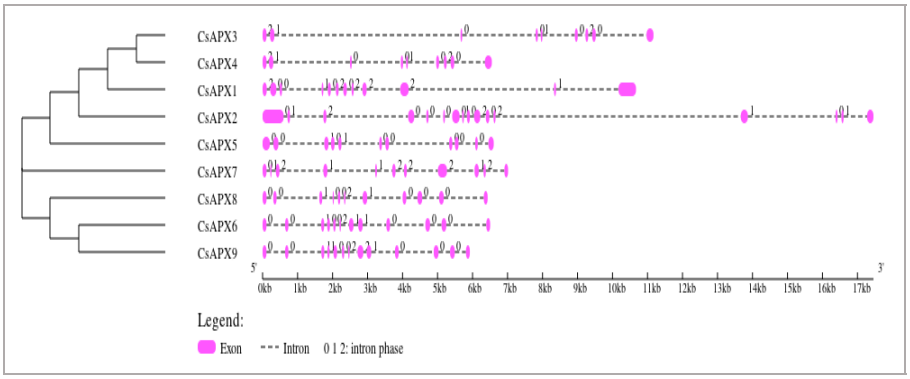
اسپلایسینگ از خود نشان دادند. الگوی فاز اسپلایسینگ در اعضای این گروه به شکل ۲۱۰۰۰۲۰، ۲۱۰۰۱۰۲۰، ۲۰۰۱۰۲۰۲۲۲۱، ۰۱۲۰۰۰۰۱۰۲۰۲۱۰۱ و ۰۰۱۰۱۰۰۰۰۰ بود. الگوی فاز اسپلایسینگ در ژن *CsAPX6* نیز به صورت ۰۱۲۱۱۲۲۲۱۲ بود (شکل ۲).

در همه ژن‌های شناسایی‌شده 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. اینترون‌های فاز صفر، یک و دو به ترتیب اینترون‌هایی هستند که قبل از اولین، بعد از اولین و بعد از نوکلئوتید دوم کدون قرار دارند. فاز یک اینترون در طول تکامل حفظ می‌شود، زیرا تغییر در فاز اینترون تنها از طریق جهش‌های همزمان امکان‌پذیر است که انتهای '۵ و '۳ اینترون را به صورت مکمل تغییر می‌دهند. توزیع فازهای اینترون غیر یکنواخت است؛ اینترون‌های فاز صفر بیشترین و اینترون‌های فاز دو کمترین فراوانی را دارند (Fedorov *et al*, 1992; Long *et al*, 1998).

دو نظریه در ارتباط با اینترون‌ها وجود دارد. نظریه اول در ارتباط با توزیع غیر یکنواخت اینترون‌ها می‌گوید که ۳۵ درصد از اینترون‌های 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 اینترون‌های قدیمی در فاز صفر قرار می‌گیرند که منجر به افزایش اینترون‌های فاز صفر شده است. با این حال، این نظریه به طور کاملی توضیح نمی‌دهد که چرا اینترون‌های فاز یک رایج‌تر از اینترون‌های فاز دو هستند (Roy, 2003).

در مقابل، نظریه دوم که نظریه الحاق اینترون (Insertional theory of introns) است پیشنهاد می‌کند که عدم یکنواختی توزیع فاز اینترون ممکن است از الحاق غیر تصادفی اینترون ناشی شده باشد. پیشنهاد شده است که اینترون‌ها 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 اینترون ناشی از الحاق اینترون باشد (Dibb and Newman, 1989). افزایش اینترون توسط مکانیسم‌های ناشناخته در نماتدها، قارچ ها و تعداد محدودی از موجودات دیگر شناسایی شده است، در حالی که از دست دادن اینترون در بسیاری از موجودات مشاهده شده است (Roy *et al.*, 2003).

بیشترین تعداد اینترون 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 الی۲۲ اینترون تشکیل شده‌اند، با این تفاوت که *AcAPX10* بدون اینترون بود (Liao *et al.*, 2020). در مطالعه دیگری در خانواده ژنی *APX* در ژنوم گندم مشخص شد که در بین تمام ژن‌ها، ۶۰ درصد اینترون در فاز صفر و پس از آن ۲۳ و ۱۷ درصد در فازهای یک و دو قرار داشتند (Tyagi *et al.*, 2020).



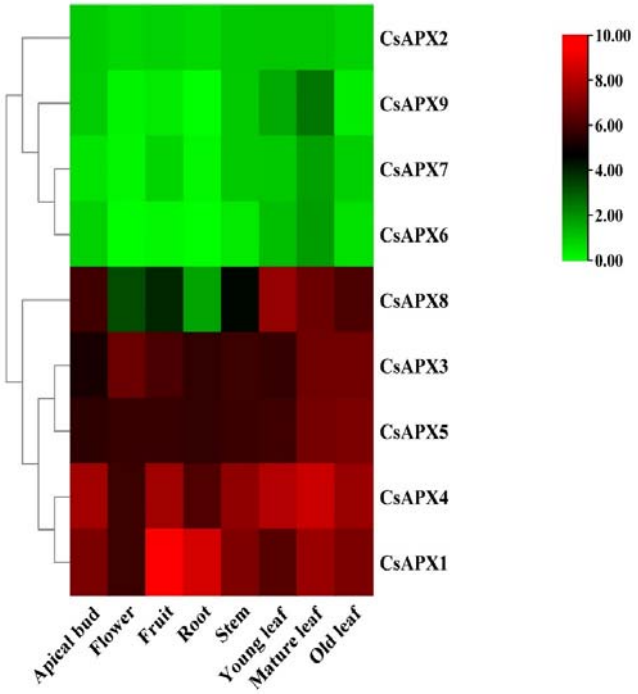
شکل ۲. ساختار اگزونی–اینترونی و فاز اسپلایسینگ در همولوگ های خانواده ژنی *APX* در چای

Figure 2. Exon-intron structure and splicing phase of *APX* gene family homologs in tea

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 *CsAX2*، *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 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 همولوگ های *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 *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.

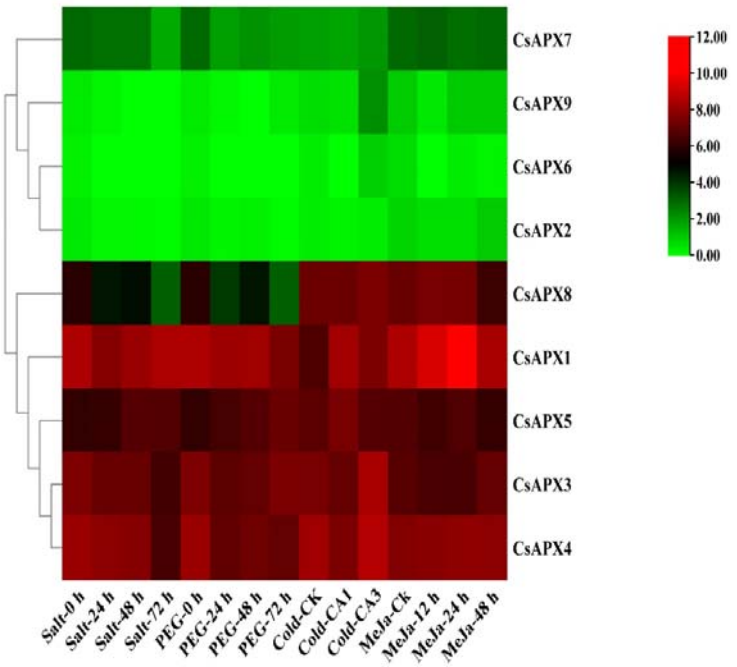


شکل ۳. الگوی بیان ژن‌های *APX* در بافت‌های مختلف چای. رنگ سبز نشان‌دهنده بیان کم و رنگ قرمز نشان‌دهنده بیان زیاد ژن است.

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. سرکوب بیان ژن *CsAPX6* در همه تنش‌های غیرزیستی 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). سرکوب بیان ژن‌های *CsAPX2, CsAPX6* و *CsAPX9* در همه تنش‌های غیرزیستی نشان می‌دهد که این ژن ها ممکن است در شرایط عادی فعال باشند و تحت شرایط تنش به منظور صرفه‌جویی در منابع سلولی، سرکوب می‌شوند.

پروفایل بیان ژن‌های *BjuAPX* و *BraAPX* در دو گونه کلزا *Brassica juncea* و *Brassica rapa* نشان داد که سه ژن *BjuAPX*، هفت ژن *BraAPX* و دو ژن *BraAPX-R* در شرایط تنش خشکی و گرما بیان می‌شوند (Verma *et al.*, 2022). همچنین در آرابیدوپسیس ژن‌های *APX3-6*، *APXT* و *APXS* از خانواده ژنی *APX*، بیان ژن متفاوتی تحت شرایط تنش داشتند. در درجه اول، نور زیاد و همچنین تنش‌های شوری و سرما به طور قابل توجهی بیان ژن را تنظیم کرد، در حالی که تنش سرما به طور قابل توجهی منجر به کاهش بیان ژن‌ها شد. الگوی بیان کلی اکوتیپ‌ها نشان داد که ژنوتیپ‌های آرابیدوپسیس مورد مطالعه تحمل به تنش متفاوتی داشتند (Filiz *et al.*, 2019).



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.

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 گوشه ای 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* احتمالا 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 نشان‌دهنده‌ی تکامل این ژن‌ها از یک ژن اجدادی قبل از واگرایی گیاهان تک‌لپه و دولپه می‌باشد. البته تعدادی از ژن‌های چای به همراه گیاهان دولپه آرابیدوپسیس 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 شناسایی‌شده 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 شناسایی‌شده 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، پلی اتیلن 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 profling of ascorbate peroxidase (APX) and glutathione peroxidase (GPX) genes 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., Flegal, 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.

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., Kornyeyev, 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., Chitikineni, 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.