

## «مقاله پژوهشی»

## شناسایی و مطالعه کارکردی خانواده ژنی لیپواکسیژناز (LOX) در گستره ژنوم برخی از گونه‌های بقولات بر پایه روش‌های بیوانفورماتیکی

سولماز عزیزی<sup>۱</sup>، ناصر زارع<sup>۲\*</sup>

۱. دانشجوی دکتری، بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

۲. استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۲۹)

### Genome-wide identification and functional analysis of lipoxygenase (LOX) gene family in some *Fabaceae* species using bioinformatics methods

Solmaz Azizi<sup>1</sup>, Nasser Zare<sup>2\*</sup>

1. Ph.D. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

2. Professor, Department of Plant Production and Genetics, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

(Received: Mar. 14, 2022 - Accepted: Jun. 29, 2022)

#### Abstract

Lipoxygenases (LOXs) are non-heme iron-containing dioxygenases involved in the apoptotic (programmed cell death) pathway and biotic and abiotic stress responses in plants. In the present study, we identified 95 LOX homologous genes from four *Fabaceae* species (*Cicer arietinum*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Medicago truncatula*), which could be divided into 9-LOX, 13-LOX type I, and type II subgroups according to their phylogenetic relationships with *Arabidopsis*, rice, barley, and foxtail millet. LOX genes are distributed unevenly across the chromosomes, and their coding enzyme is active in the cytoplasm and chloroplast. These genes are intron rich, have six to nine introns, and are conserved in gene structure and intron phase. All identified genes have the conserved lipoxygenase and PLAT/LH2 domains. Several cis-acting elements related to hormones and stresses, such as ERE, MYB, and MYC in the LOXs promoters, indicated the role of these genes in plant development and responses to environmental stresses. In addition, different miRNA molecules were identified that regulate the post-transcriptional expression of LOXs genes through cleavage or inhibition of translation. Transcriptome data-based gene expression analysis showed that *Glycine max* LOXs expression pattern differed under abiotic stress conditions, and *GmLOX4*, *GmLOX21*, *GmLOX25*, *GmLOX5*, *GmLOX22*, *GmLOX24*, *GmLOX14*, *GmLOX16*, *GmLOX7*, and *GmLOX26* were highly expressed in response to salt, drought, cold and heat stresses, indicating that they can improve the tolerance of *Glycine max* to abiotic stress. This study provides valuable information for a better understanding of the function of LOX genes and further exploration of the LOX gene family in *Fabaceae*.

**Keywords:** Evolution, Gene Expression, *In silico* analysis, Promoter

#### چکیده

لیپواکسیژنازها (LOX) دی‌اکسیژنازهای دارای آهن غیرهم بوده و در مسیر آپوپتوتیک (مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول)، پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش دارند. در این مطالعه ۹۵ ژن همولوگ LOX در چهار گونه از خانواده بقولات (نخود، سویا، لوبیا و بونجه یکساله) شناسایی شد که این ژن‌ها بر اساس روابط فیلوژنتیکی با آراییدوپسیس، برنج، ارزن و جو به زیرگروه‌های 9-LOX، 13-LOX، 13-LOX تیپ یک و 13-LOX تیپ دو تقسیم می‌شوند. ژن‌های LOX به صورت غیریکنواخت بر روی کروموزوم‌ها پخش شده‌اند. آنزیم‌های کد شده به وسیله این ژن‌ها در سیتوپلاسم و کلروپلاست فعال هستند. این ژن‌ها غنی از اینترون دارای شش تا نه اینترون بوده و دارای ساختار ژنی و فاز اینترونی حفاظت‌شده هستند. ژن‌های LOX مورد مطالعه دارای دارای دمین‌های حفاظت‌شده لیپواکسیژناز و PLAT/LH2 هستند. وجود چندین عنصر تنظیمی سیس پاسخ به هورمون‌ها و تنش‌ها نظیر ERE، MYB و MYC در پروموتور ژن‌های LOX نشان‌دهنده نقش این ژن‌ها در نمو گیاه و پاسخ آن‌ها به تنش‌های محیطی می‌باشد. افزون بر این، انواع مولکول‌های miRNA شناسایی شده بیان پس از رونویسی ژن‌های LOX را از طریق برش یا ممانعت از ترجمه تنظیم می‌کند. آنالیز بیان ژن‌ها بر پایه داده‌های ترانسکریپتومیکس نشان داد که الگوی بیان ژن‌های LOX سویا در شرایط تنش‌های غیرزیستی متفاوت بوده و ژن‌های *GmLOX21*، *GmLOX4*، *GmLOX25*، *GmLOX5*، *GmLOX22*، *GmLOX24*، *GmLOX14*، *GmLOX16*، *GmLOX7* و *GmLOX26* بیان بالایی در پاسخ به شوری، خشکی، سرما و گرما دارند که بر نقش آن‌ها در افزایش تحمل سویا به تنش‌های غیرزیستی دلالت دارد. این مطالعه اطلاعات ارزشمندی را برای درک بهتر کارکردهای ژن‌های LOX و کشفیات بیشتر خانواده ژنی LOX بقولات فراهم می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** بیان ژن، پروموتور، تجزیه این‌سیلیکو، تکامل

## مقدمه

گیاهان به‌عنوان موجوداتی که توانایی حرکت ندارند، سیستم پیچیده دفاعی برای پاسخ به تنش‌هایی مانند شوری، خشکی، اسمزی و آفات و بیماری‌ها ایجاد کرده‌اند. سیستم دفاعی گیاهی را در سه سطح مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی می‌توان مورد ارزیابی قرار داد. از جمله عوامل مولکولی و بیوشیمیایی درگیر در این سیستم دفاعی می‌توان به انواع عوامل رونویسی، گیرنده‌ها، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و هورمون‌ها اشاره کرد (Upadhyay *et al.*, 2019). از میان هورمون‌های گیاهی جاسمونات (JA) به‌عنوان هورمون تنش شناخته می‌شود، چراکه توانایی فعال کردن سیستم دفاع گیاه در برابر تنش‌ها را دارد (Sharma & Laxmi, 2016). این هورمون از کلاس ترکیبات اکسی‌لپین‌ها<sup>۱</sup> بوده و طی فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز (LOX; EC 1.13.11.12) از اسیدهای چرب هیدروکسی‌پراکسید ایجاد می‌شود. لیپواکسیژناز که از خانواده دی‌اکسیژنازهای دارای آهن غیرهم<sup>۲</sup> می‌باشد در بسیاری از موجودات زنده شامل گیاهان، جانوران، قارچ‌ها و باکتری‌ها شناسایی شده است (Banthiya *et al.*, 2016). آنزیم‌های لیپواکسیژناز به گروه‌های ۵، ۸، ۹، ۱۰، ۱۲، ۱۳ و ۱۵ تقسیم می‌شوند که در میان آن‌ها گروه‌های ۹ و ۱۳ مخصوص گیاهان و گروه‌های ۵، ۱۲ و ۱۵ مربوط به جانوران است (Viswanath *et al.*, 2020). این آنزیم توانایی اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع مانند لینولنیک اسید و لینولئیک اسید را داشته و با واکنش کاتالیزوری خود هیدروکسی‌های اسیدهای چرب غیراشباع را تولید می‌کند (Wenman *et al.*, 2016). از نظر آنزیم‌شناسی، LOXها در واقع لینولئات: اکسیژن اکسیدوردوکتاز بوده و به‌عنوان یک

آنزیم چندکاره شناخته می‌شوند که حداقل در سه نوع واکنش کاتالیتیکی شامل واکنش پراکسیداسیون لیپید (واکنش پراکسیدازی)، تبدیل پراکسید لیپید (واکنش هیدروژن پراکسیدازی) و واکنش سنتز لئوکوترین<sup>۳</sup> نقش دارد (Li *et al.*, 2014). امروزه مشخص شده است که LOXها به‌وسیله خانواده‌های چندژنی کد شده و در اندامک‌های مختلف سلول که در تولید مولکول‌های پیام‌رسان نقش دارند فعال هستند. لذا LOXها دارای کارکردهای متفاوتی بوده و در رشد و نمو، جوانه‌زنی بذر، رسیدگی میوه، پیری، مرگ سلولی، سنتز هورمون‌های آبسزیک اسید (ABA) و جاسمونیک اسید (JA)، پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی نقش دارند (Chen *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019; Viswanath *et al.*, 2020).

با توجه به اهمیت خانواده ژنی LOX در پاسخ گیاهان به تنش‌ها، در این مطالعه خانواده ژنی LOX در گیاهان نخود (*Cicer arietinum*)، سویا (*Glycine max*)، لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) و یونجه یکساله (*Medicago truncatula*) که از خانواده بقولات هستند شناسایی و ویژگی‌های عمومی آن‌ها، روابط فیلوژنتیکی، ساختار ژنی، زمین‌های حفاظت‌شده، عناصر تنظیم‌کننده سپس ناحیه پروموتری، تنظیم بیان پس از رونویسی و بیان ژن‌های LOX سویا در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی مطالعه گردید.

## پیشینه پژوهش

از جمله کارکردهای زیستی مهم آنزیم لیپواکسیژناز، نقش آن‌ها در پاسخ گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی است. بررسی نقش ژن *LOX1* در فلفل نشان داده که این ژن در پاسخ به تنش‌های شوری، خشکی و اسمزی دارای نقش حیاتی بوده و فرایان

1. Oxylinp  
2. Nonheme iron-containing

3. Leukotriene

ساختاری و کارکردی آنها مطالعه شده است (Umate, 2011; Liu *et al.*, 2021; Kang *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021; Shaban *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2018). بر این اساس مشخص شده است که LOXهای گیاهی دارای یک دمین حفاظت شده لیپواکسیژناز در انتهای کربوکسیل و یک دمین PLAT/LH2 در انتهای آمین می باشند (Tolley *et al.*, 2018). دمین LOX دارای ۵ اسید آمینه هیستیدین حفاظت شده بوده و تشکیل His-18-His-17-His-(X)-4-His-(X)-4-His می دهد که در اتصال اتم آهن نقش دارد. دمین PLAT/LH2 به صورت هشت رشته آنتی پارالل بشکله ای<sup>۱</sup> بوده و در اتصال به پروکولپاز<sup>۲</sup> دارای نقش است (Wang *et al.*, 2019).

همچنین بر اساس اینکه سوبسترای آنزیم در کربن شماره ۹ یا ۱۳ اکسیژنه می شود، LOXهای گیاهی به دو گروه 9-LOX و 13-LOX تقسیم می شوند (Feussner & Wasternack, 2002). از سوی دیگر بر اساس ساختار اولیه و میزان تشابه توالی ها، LOXهای گیاهی به دو زیر خانواده تقسیم می شوند. LOXهای تیپ یک که فاقد پپتید موقت بوده و تشابه توالی بالای ۷۵ درصد را نشان می دهند. در مقابل LOXهای تیپ دو دارای پپتید موقت بوده و تشابه توالی پروتئینی آنها در حدود ۳۵ درصد می باشد. تیپ دو انحصاراً مربوط به گروه 13-LOXها هستند (Porta *et al.*, 2002; Rosahl, 1996). مطالعات تکاملی انجام گرفته نشان داده است که گروه های 9-LOX و 13-LOX در زیرگروه های متفاوت درخت فیلوژنتیکی قرار می گیرند (Liu *et al.*, 2021; Kang *et al.*, 2021).

این ژن در آراییدوپسیس باعث مقاومت آن به تنش های غیرزیستی از طریق کاهش تجمع H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش بیان ژن های *COR15A*, *P5CS*, *RD29B*, *RD29A*, *RD20* و *DEREB2A* می شود (Lim *et al.*, 2015). همچنین میزان فعالیت کل LOX ارزن مرواریدی در پاسخ به تنش های خشکی و نیکل افزایش یافته و از طریق تأثیر بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان تأثیر منفی این تنش ها را کاهش می دهد (Kotapati *et al.*, 2017). بیان LOX در پاسخ به هورمون های JA، ABA، سالسیلیک اسید (SA) و نیتریک اسید (NO) القا می شود. در آراییدوپسیس بیان ژن *LOX1* در پاسخ به JA و ABA در گیاه بالغ القاء می شود در حالی که ژن *LOX2* بیان بالایی را در برگ نشان داده و میزان بیان آن در ریشه، ساقه و بذر کم است. همچنین بیشترین بیان ژن *LOX6* در این گیاه مربوط به ریشه می باشد. این نتایج نشان دهنده اهمیت ژن های LOX در پاسخ به تنش های غیرزیستی و نیز عملکرد اختصاصی آنها در پاسخ به تنش می باشد. لذا شناسایی این ژن ها و بررسی نقش کارکردی آنها می تواند نقش مهمی در تولید گیاهان مقاوم به تنش ها داشته باشد (Viswanath *et al.*, 2020).

پیشرفت های انجام گرفته در تکنولوژی توالی یابی ژنوم موجب ایجاد پایگاه داده های متنوع برای ژنوم بسیاری از موجودات از جمله گیاهان گردید. این پایگاه داده ها فرصتی برای پژوهشگران بود تا با استفاده از ابزارهای محاسباتی و بیوانفورماتیکی در مورد تکامل و کارکرد خانواده های ژنی مطالعه کرده و اطلاعات لازم جهت انجام مطالعات آزمایشگاهی را داشته باشند. لذا امروزه مطالعه خانواده های ژنی توجه پژوهشگران را جلب کرده است. از جمله این خانواده ها می توان به LOX اشاره کرد. این خانواده در بسیاری از گیاهان مانند آراییدوپسیس، برنج، ذرت، موز، کزنا، چای، ارزن، و پنبه شناسایی و روابط تکاملی،

1. Antiparallel barrel  
2. Procolipase

## روش‌شناسی پژوهش

### شناسایی اعضا خانواده ژنی LOX

شناسایی اعضا خانواده ژنی LOX در نخود، لوبیا، سویا و یونجه یکساله با استفاده از الگوریتم tBLASTn انجام شد. بدین‌منظور توالی پروتئینی LOX برنج از پایگاه داده (<http://rice.uga.edu>) و آرآبیدوپسیس از پایگاه داده TAIR (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>) دریافت و در مرحله بعد به‌عنوان توالی اولیه جهت جستجوی توالی‌های همولوگ با روش tBLASTn در پایگاه داده فایتوزوم (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>) استفاده شد. سپس نتایج تکراری حذف و توالی‌های باقی‌مانده به سرور SMART (<http://smart.embl.de>) ارائه شد تا وجود دمین‌های اختصاصی Lipoxigenase و PLAT/LH2 بررسی شود (Zhang *et al.*, 2021). تنها ژن‌هایی که دارای هر دو دمین بودند به‌عنوان ژن LOX در نظر گرفته شدند. برای نام‌گذاری ژن‌های شناسایی‌شده ابتدا با توجه به نام گیاه، پیشوند Mt برای یونجه یکساله، Gm برای سویا، Pv برای لوبیا و Ca برای نخود در نظر گرفته شد. سپس LOX اضافه‌شده و در نهایت شماره ژن که بر پایه جایگاه کروموزومی ژن‌ها بود اضافه گردید.

### درخت فیلوژنتیکی ژن‌های LOX

برای رسم درخت فیلوژنتیکی و بررسی روابط تکاملی بین ژن‌های LOX، توالی پروتئینی این آنزیم در آرآبیدوپسیس، برنج، ارزن و جو بر اساس اطلاعات قبلی دریافت شد. در مرحله بعد هم‌ردیفی این توالی‌ها همراه با توالی پروتئینی LOX نخود، لوبیا، یونجه یکساله و سویا از طریق سرور ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) انجام گردید. نتیجه این مرحله که در فرمت Fasta

بود جهت رسم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 و الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه‌ها (NJ) و با بوت‌استرپ برابر با ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد (Kumar *et al.*, 2016).

### مطالعه ویژگی‌های پروتئینی، دمین‌های حفاظت‌شده و ساختار آگزون-اینترونی خانواده ژنی LOX

ویژگی‌های عمومی آنزیم‌های LOX شامل وزن مولکولی، طول پروتئین و نقطه ایزوالکتریک با استفاده از سرور ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>) ارزیابی شد. جایگاه سلولی این آنزیم‌ها از طریق سرور CELLO پیش‌بینی شد. همچنین برای شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده از سرور MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) استفاده شد که پارامترها شامل شناسایی ۲۰ موتیف با حداقل و حداکثر طول ۶ تا ۵۰ اسید آمینه می‌باشد. نتیجه این آنالیز با به‌کارگیری نرم‌افزار TBtools مصورسازی شد (Chen *et al.*, 2020). ساختار آگزون-اینترونی و فاز اینترونی ژن‌های LOX در گیاهان مورد مطالعه با استفاده از سرور GSDS (<http://gsds.gao-lab.org>) بررسی شد. جهت استفاده از این سرور نیاز به توالی‌های DNA ژنومی و CDS می‌باشد.

### شناسایی عناصر تنظیمی سیس پاسخ به هورمون‌ها و

تنش‌ها و بررسی مولکول‌های miRNA واکنش‌گر به‌منظور شناسایی عناصر تنظیمی سیس پاسخ به هورمون‌ها و تنش‌ها در ژن‌های LOX گیاهان مورد مطالعه، ۱۵۰۰ جفت باز بالادست ناحیه کدکننده ژن‌ها به‌عنوان پروموتور در نظر گرفته شد. در ادامه شناسایی عناصر تنظیمی سیس با به‌کارگیری سرور PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) انجام شد. شناسایی مولکول‌های miRNA واکنش‌گر به

۲۱ ژن در لوبیا (*PvLOX1-PvLOX21*)، ۲۵ ژن در یونجه یکساله (*MtLOX1-MtLOX25*) و ۳۲ ژن در سویا (*GmLOX1-GmLOX32*) می‌باشد (جدول ۱). بررسی جایگاه ژن‌های LOX نشان داد که این ژن‌ها به صورت غیریکنواخت بر روی کروموزوم‌ها قرار گرفته‌اند. در نخود بر روی هر یک از کروموزوم‌های ۳ و ۸ یک ژن، بر روی هر یک از کروموزوم‌های ۱، ۴ و ۶ دو ژن، بر روی کروموزوم ۵ چهار ژن و بر روی کروموزوم ۷ پنج ژن قرار دارد. در لوبیا بر روی هر یک از کروموزوم‌های ۹ و ۱۱ یک ژن، بر روی کروموزوم ۲ دو ژن، بر روی کروموزوم ۵ چهار ژن، بر روی کروموزوم‌های ۶ و ۷ سه ژن و بر روی کروموزوم ۱۰ هفت ژن قرار گرفته‌است. همچنین در یونجه یکساله کروموزوم‌های ۵ و ۷ دارای یک ژن، کروموزوم‌های ۱، ۲ و ۴ دارای دو ژن، کروموزوم ۳ دارای چهار ژن و کروموزوم ۸ دارای ۱۳ ژن هستند. در سویا مشخص شد که یک ژن بر روی هر یک از کروموزوم‌های ۱۰، ۱۲ و ۱۹، دو ژن بر روی هر یک از کروموزوم‌های ۱۱ و ۱۶، سه ژن بر روی هر یک از کروموزوم‌های ۳ و ۱۵، چهار ژن بر روی هر یک از کروموزوم‌های ۸ و ۲۰، پنج ژن بر روی کروموزوم ۷ و شش ژن بر روی کروموزوم ۱۳ قرار دارد (جدول ۱).

ژن‌های LOX و مؤثر بر تنظیم بیان پس از رونویسی این ژن‌ها با استفاده از سرور <https://www.zhaolab.org/> psRNATarget (<https://www.zhaolab.org/>) انجام شد.

### الگوی بیان خانواده ژنی LOX سویا در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی

بررسی الگوی بیان ژن‌های LOX سویا جهت درک کارکرد احتمالی آن‌ها در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی شامل شوری، خشکی، سرما و گرما با به‌کارگیری پایگاه‌داده بیانی دانشگاه‌های علوم و تکنولوژی جنوب و پکن (<http://ipf.sustech.edu.cn/pub/soybean>) انجام گرفت. داده‌های بیانی FPKM دریافتی جهت نرمال‌سازی به صورت  $\text{Log}_2(\text{FPKM}+1)$  تبدیل و سپس نقشه حرارتی با استفاده از نرم‌افزار TBtools رسم شد (Chen *et al.*, 2020).

## نتایج و بحث

### شناسایی اعضا خانواده ژنی LOX در نخود، لوبیا، سویا و یونجه یکساله

از طریق الگوریتم tBLASTn و پس از حذف توالی‌های فاقد دمین‌های لیبواکسیژناز و PLAT/LH2، ۹۵ ژن LOX شناسایی شد که شامل ۱۷ ژن در نخود (*CaLOX1-CaLOX17*).

جدول ۱. مشخصات عمومی ژن‌های LOX در نخود، لوبیا، یونجه یکساله و سویا

شماره دسترسی (پایگاه فایتوزوم)	نام ژن	کروموزوم	شروع ژن (bp)	پایان ژن (bp)	طول پروتئین (اسید آمینه)	وزن پروتئین (کیلو دالتون)	pI	جایگاه سلولی
Ca_02721	<i>CaLOX1</i>	Chr01	۱۰۵۱۵۰۴۴	۱۰۵۱۸۴۶۷	۸۶۲	۵۰۹۷	۲۲.۶	سیتوپلاسم
Ca_02720	<i>CaLOX2</i>	Chr01	۱۰۵۲۰۱۳۴	۱۰۵۲۴۴۴۲	۸۶۰	۹۵.۹۶	۸۶.۵	سیتوپلاسم
Ca_01161	<i>CaLOX3</i>	Chr03	۳۸۱۷۴۷۱۶	۳۸۱۷۹۷۰۰	۸۴۱	۹۲.۹۵	۹۹.۵	سیتوپلاسم
Ca_03682	<i>CaLOX4</i>	Chr04	۵۶۵۶۰۹۸	۵۶۶۲۵۳۵	۸۴۹	۲۸.۹۷	۹۶.۶	کلروپلاست
Ca_04606	<i>CaLOX5</i>	Chr04	۱۳۸۰۱۱۹۱	۱۳۸۰۶۷۸۵	۸۵۹	۹۵.۹۷	۵۴.۶	کلروپلاست
Ca_07552	<i>CaLOX6</i>	Chr05	۴۰۲۸۳۲۰۹	۴۰۲۸۷۵۷۸	۸۵۸	۱۳.۹۸	۴۱.۵	کلروپلاست
Ca_07553	<i>CaLOX7</i>	Chr05	۴۰۳۰۰۲۵۰	۴۰۳۰۵۵۰۷	۸۳۵	۸۲.۹۵	۳.۶	کلروپلاست
Ca_07554	<i>CaLOX8</i>	Chr05	۴۰۳۰۶۹۰۶	۴۰۳۱۳۳۷۴	۷۷۹	۲۹.۸۹	۸۵.۵	کلروپلاست
Ca_07556	<i>CaLOX9</i>	Chr05	۴۰۳۴۰۴۱۱	۴۰۳۴۴۳۳۱	۸۴۶	۷۵.۹۶	۲.۶	کلروپلاست
Ca_20483	<i>CaLOX10</i>	Chr06	۱۱۱۶۹۱۳۵	۱۱۱۷۶۴۲۹	۹۰۸	۸۶.۱۰۲	۵۴.۸	سیتوپلاسم
Ca_18906	<i>CaLOX11</i>	Chr06	۵۳۷۳۷۵۴۳	۵۳۷۴۳۷۵۴	۹۰۸	۰۱.۱۰۴	۰۷.۶	کلروپلاست
Ca_10057	<i>CaLOX12</i>	Chr07	۳۲۱۲۶۸۲۹	۳۲۱۳۱۲۶۶	۸۶۹	۸۹.۹۷	۸۸.۵	سیتوپلاسم

ادامه جدول ۱. مشخصات عمومی ژن‌های LOX در نخود، لوبیا، یونجه یکساله و سویا

شماره دسترسی (پایگاه فایتوزوم)	نام ژن	کروموزوم	شروع ژن (bp)	پایان ژن (bp)	طول پروتئین (اسید آمینه)	وزن پروتئین (کیلو دالتون)	pI	جایگاه سلولی
Ca_10056	<i>CaLOX13</i>	Chr07	۳۲۱۴۸۰۸۲	۳۲۱۵۲۶۶۱	۸۶۹	۷۹.۹۷	۱۴.۶	سیتوپلاسم
Ca_10055	<i>CaLOX14</i>	Chr07	۳۲۱۵۸۰۳۸	۳۲۱۶۲۸۴۰	۸۶۹	۶۴.۹۷	۶۷.۶	سیتوپلاسم
Ca_10054	<i>CaLOX15</i>	Chr07	۳۲۱۹۹۸۷۶	۳۲۲۰۴۳۷۹	۸۶۵	۲۲.۹۷	۰۷.۶	سیتوپلاسم
Ca_09997	<i>CaLOX16</i>	Chr07	۳۳۰۲۴۵۵۰	۳۳۰۳۳۱۱۲	۹۸۵	۴۴.۱۰۹	۶۴.۷	سیتوپلاسم
Ca_10731	<i>CaLOX17</i>	Chr08	۶۵۷۷۷۱۹	۶۵۸۲۱۷۲	۸۶۸	۷۹.۹۸	۰۳.۶	سیتوپلاسم
Phvul.002G175500	<i>PvLOX1</i>	Chr02	۳۳۳۶۹۰۳۹	۳۳۳۷۴۳۰۷	۹۱۷	۱۹.۱۰۳	۰۸.۷	سیتوپلاسم
Phvul.002G228700	<i>PvLOX2</i>	Chr02	۴۰۰۸۳۴۱۹	۴۰۰۸۹۹۸۸	۸۶۶	۱۳.۹۸	۶۷.۶	سیتوپلاسم
Phvul.005G156700	<i>PvLOX3</i>	Chr05	۳۸۵۵۳۴۰۴	۳۸۵۵۷۴۱۶	۸۷۰	۵۶.۹۷	۲۲.۶	سیتوپلاسم
Phvul.005G156800	<i>PvLOX4</i>	Chr05	۳۸۵۵۹۱۱۹	۳۸۵۶۷۲۶۴	۸۵۷	۲۸.۹۶	۱۴.۶	سیتوپلاسم
Phvul.005G156900	<i>PvLOX5</i>	Chr05	۳۸۵۷۹۲۸۶	۳۸۵۸۳۰۷۴	۸۵۷	۱۴.۹۶	۶۹.۶	سیتوپلاسم
Phvul.005G157000	<i>PvLOX6</i>	Chr05	۳۸۵۸۴۳۹۲	۳۸۵۸۷۹۸۰	۸۶۱	۳۷.۹۷	۳۲.۶	سیتوپلاسم
Phvul.006G016900	<i>PvLOX7</i>	Chr06	۷۸۷۴۸۱۲	۷۸۸۳۵۷۸	۹۱۲	۴۴.۱۰۳	۷۶.۶	کلروپلاست
Phvul.006G017100	<i>PvLOX8</i>	Chr06	۷۹۹۲۹۸۱	۸۰۰۰۴۰۸	۸۵۰	۲۴.۹۷	۴۹.۶	کلروپلاست
Phvul.006G091400	<i>PvLOX9</i>	Chr06	۲۰۳۰۵۱۴۳	۲۰۳۱۱۲۰۶	۸۶۴	۶۵.۹۸	۰۹.۶	سیتوپلاسم
Phvul.007G055600	<i>PvLOX10</i>	Chr07	۴۶۳۲۸۸۵	۴۶۴۰۹۲۳	۸۵۶	۵۵.۹۷	۹۵.۶	سیتوپلاسم
Phvul.007G055800	<i>PvLOX11</i>	Chr07	۴۶۵۷۰۷۴	۴۶۶۳۳۶۳	۸۵۷	۷۷.۹۷	۷۷.۷	کلروپلاست
Phvul.007G179600	<i>PvLOX12</i>	Chr07	۳۰۰۱۷۵۷۹	۳۰۰۲۳۶۱۸	۸۶۲	۰۱.۹۸	۰۸.۶	سیتوپلاسم
Phvul.009G262900	<i>PvLOX13</i>	Chr09	۳۸۱۸۷۵۰۲	۳۸۱۹۱۶۵۹	۹۰۰	۵۹.۱۰۱	۲۵.۸	سیتوپلاسم
Phvul.010G128800	<i>PvLOX14</i>	Chr10	۴۰۰۹۶۷۷۰۹	۴۰۰۹۷۳۶۱۲	۹۲۰	۵۴.۱۰۳	۸۹.۷	سیتوپلاسم
Phvul.010G134700	<i>PvLOX15</i>	Chr10	۴۱۶۸۴۰۷۷	۴۱۶۸۸۴۰۱	۸۳۴	۱۳.۹۵	۹۱.۶	سیتوپلاسم
Phvul.010G134800	<i>PvLOX16</i>	Chr10	۴۱۷۰۵۲۱۱	۴۱۷۱۰۰۲۰	۸۶۳	۲۸.۹۷	۶۸.۶	سیتوپلاسم
Phvul.010G134900	<i>PvLOX17</i>	Chr10	۴۱۷۱۷۱۳۱	۴۱۷۲۲۸۷۶	۸۶۶	۳۸.۹۶	۰۲.۷	سیتوپلاسم
Phvul.010G135000	<i>PvLOX18</i>	Chr10	۴۱۷۳۴۱۹۷	۴۱۷۴۱۳۷۵	۸۳۰	۹۷.۹۳	۲۲.۹	سیتوپلاسم
Phvul.010G135800	<i>PvLOX19</i>	Chr10	۴۱۸۵۸۰۸۳	۴۱۸۶۳۱۹۹	۸۶۶	۰۲.۹۷	۵۷.۶	سیتوپلاسم
Phvul.010G135900	<i>PvLOX20</i>	Chr10	۴۱۸۷۱۹۲۲	۴۱۸۷۶۷۰۰	۸۶۸	۶۹.۹۷	۶۹.۶	سیتوپلاسم
Phvul.011G056500	<i>PvLOX21</i>	Chr11	۴۹۸۴۸۷۵	۴۹۹۰۹۲۴	۹۰۳	۷۶.۱۰۲	۴۹.۶	کلروپلاست
Medtr1g083020	<i>MtLOX1</i>	Chr01	۳۶۹۲۰۶۵۵	۳۶۹۳۷۱۱۴	۸۵۹	۶۶.۹۷	۱۶.۶	سیتوپلاسم
Medtr1g104650	<i>MtLOX2</i>	Chr01	۴۷۱۲۶۰۹۵	۴۷۱۳۲۵۸۳	۸۵۷	۲۷.۹۷	۶۵.۶	کلروپلاست
Medtr2g099560	<i>MtLOX3</i>	Chr02	۴۲۶۸۶۱۷۳	۴۲۶۹۰۳۳۸	۸۶۴	۹۳.۹۶	۲۲.۶	سیتوپلاسم
Medtr2g099570	<i>MtLOX4</i>	Chr02	۴۲۶۹۱۷۴۷	۴۲۶۹۷۴۳۷	۸۶۲	۴.۹۷	۵۲.۶	سیتوپلاسم
Medtr3g079420	<i>MtLOX5</i>	Chr03	۳۵۷۰۵۵۸۲	۳۵۷۰۹۳۳۱	۸۶۶	۴۴.۹۹	۸.۵	کلروپلاست
Medtr3g079450	<i>MtLOX6</i>	Chr03	۳۵۷۱۹۸۴۳	۳۵۷۲۵۳۰۰	۹۰۳	۲۶.۱۰۳	۴۹.۶	کلروپلاست
Medtr3g479460	<i>MtLOX7</i>	Chr03	۳۵۷۲۵۴۵۳	۳۵۷۲۹۸۳۵	۹۰۴	۰۷.۱۰۳	۰۳.۷	کلروپلاست
Medtr3g081130	<i>MtLOX8</i>	Chr03	۳۶۷۴۲۸۴۱	۳۶۷۴۶۶۲۹	۸۵۹	۴۱.۹۷	۵۲.۶	سیتوپلاسم
Medtr4g066170	<i>MtLOX9</i>	Chr04	۳۴۹۵۹۹۲۱	۳۴۹۶۸۳۰۴	۹۰۷	۵۸.۱۰۳	۳۷.۵	کلروپلاست
Medtr4g088810	<i>MtLOX10</i>	Chr04	۳۵۴۰۹۰۷۵	۳۵۴۱۵۱۵۶	۸۹۶	۶۹.۱۰۱	۸۲.۷	سیتوپلاسم
Medtr5g024020	<i>MtLOX11</i>	Chr05	۹۶۰۰۴۸۲	۹۶۰۷۰۳۳	۸۶۸	۰۲.۹۸	۳۲.۶	سیتوپلاسم
Medtr7g113410	<i>MtLOX1</i>	Chr07	۴۶۷۰۸۵۵۳	۴۶۷۱۴۸۱۹	۸۶۸	۳۶.۹۸	۰۹.۶	کلروپلاست
Medtr8g018420	<i>MtLOX1</i>	Chr08	۶۲۶۱۴۰۸	۶۲۶۶۱۹۹	۸۵۷	۱۸.۹۶	۱۶.۵	سیتوپلاسم
Medtr8g018430	<i>MtLOX1</i>	Chr08	۶۲۷۳۰۲۷	۶۲۷۷۳۶۵	۸۶۲	۶۳.۹۷	۶۹.۷	سیتوپلاسم
Medtr8g018450	<i>MtLOX1</i>	Chr08	۶۲۸۷۲۱۸	۶۲۹۱۶۸۳	۸۲۹	۷۴.۹۴	۳۶.۶	سیتوپلاسم
Medtr8g018510	<i>MtLOX1</i>	Chr08	۶۳۱۹۶۱۹	۶۳۲۴۶۰۳	۸۷۰	۸۱.۹۷	۷.۶	سیتوپلاسم
Medtr8g018520	<i>MtLOX1</i>	Chr08	۶۳۳۰۳۶۸	۶۳۴۰۱۵۹	۸۶۹	۱.۹۸	۴۵.۶	سیتوپلاسم
Medtr8g018550	<i>MtLOX1</i>	Chr08	۶۳۵۰۴۷۵	۶۳۵۶۲۱۴	۸۶۹	۷۳.۹۷	۲۳.۶	سیتوپلاسم
Medtr8g018570	<i>MtLOX1</i>	Chr08	۶۳۶۱۴۹۹	۶۳۶۵۵۵۶	۸۷۱	۲۷.۹۸	۱۷.۶	سیتوپلاسم
Medtr8g018690	<i>MtLOX2</i>	Chr08	۶۴۲۲۴۶۶	۶۴۲۶۸۵۲	۸۶۶	۷.۹۶	۶۴.۶	سیتوپلاسم
Medtr8g018730	<i>MtLOX2</i>	Chr08	۶۴۴۸۹۸۱	۶۴۵۴۳۹۷	۸۶۵	۰۲.۹۷	۱۴.۶	سیتوپلاسم
Medtr8g018735	<i>MtLOX2</i>	Chr08	۶۴۵۵۵۰۴	۶۴۵۹۴۳۸	۸۶۶	۹۵.۹۶	۳۱.۶	سیتوپلاسم

ادامه جدول ۱. مشخصات عمومی ژن‌های LOX در نخود، لوبیا، یونجه یکساله و سویا

شماره دسترسی (پایگاه فایتوزوم)	نام ژن	کروموزوم	شروع ژن (bp)	پایان ژن (bp)	طول پروتئین (اسید آمینه)	وزن پروتئین (کیلو دالتون)	pI	جایگاه سلولی
Medtr8g020970	<i>MtLOX23</i>	Chr08	۷۴۳۶۳۲۶	۷۴۴۳۷۰۷	۹۲۸	۸۲.۱۰۴	۹۴.۷	سیتوپلاسم
Medtr8g020990	<i>MtLOX24</i>	Chr08	۷۴۵۷۳۸۵	۷۴۶۳۲۲۸	۸۶۹	۳۶.۹۷	۸۱.۶	سیتوپلاسم
Medtr8g080230	<i>MtLOX25</i>	Chr08	۳۴۴۶۶۶۷۱	۳۴۴۷۳۸۵۸	۹۱۷	۹۹.۱۰۲	۴۲.۷	سیتوپلاسم
Glyma.03G091000	<i>GmLOX1</i>	Chr03	۲۸۲۲۶۱۲۵	۲۸۲۳۳۸۰۷	۸۶۷	۵.۹۹	۰۴.۹	سیتوپلاسم
Glyma.03G237300	<i>GmLOX2</i>	Chr03	۴۴۸۹۴۶۷۲	۴۴۹۰۱۴۶۵	۸۵۹	۶۶.۹۷	۱۱.۶	سیتوپلاسم
Glyma.03G264300	<i>GmLOX3</i>	Chr03	۴۶۸۱۶۵۴۷	۴۶۸۸۱۴۸۵	۹۰۲	۱۵.۱۰۲	۹۶.۷	سیتوپلاسم
Glyma.07G007000	<i>GmLOX4</i>	Chr07	۵۱۰۲۵۶	۵۱۵۰۵۴	۸۶۶	۹.۹۶	۰۵.۶	سیتوپلاسم
Glyma.07G034800	<i>GmLOX5</i>	Chr07	۲۷۶۶۲۷۰	۲۷۷۲۸۵۹	۸۷۶	۶.۹۷	۱۴.۷	سیتوپلاسم
Glyma.07G034900	<i>GmLOX6</i>	Chr07	۲۷۸۴۸۸۳	۲۷۹۰۷۵۸	۸۶۹	۸۸.۹۷	۴۹.۶	سیتوپلاسم
Glyma.07G039900	<i>GmLOX7</i>	Chr07	۳۲۹۰۸۲۳	۳۲۹۷۳۴۳	۹۲۸	۳۵.۱۰۴	۵۴.۷	سیتوپلاسم
Glyma.07G196800	<i>GmLOX8</i>	Chr07	۳۶۸۵۲۱۰۳	۳۶۸۶۲۱۹۰	۹۱۱	۰۵.۱۰۳	۳۳.۷	سیتوپلاسم
Glyma.08G102900	<i>GmLOX9</i>	Chr08	۷۸۸۶۰۰۴	۷۸۹۱۹۸۳	۹۲۲	۶۹.۱۰۳	۱.۸	سیتوپلاسم
Glyma.08G189500	<i>GmLOX10</i>	Chr08	۱۵۲۸۷۹۱۶	۱۵۲۹۳۸۳۴	۸۶۸	۷۸.۹۷	۸۵.۵	سیتوپلاسم
Glyma.08G189600	<i>GmLOX11</i>	Chr08	۱۵۳۱۶۶۸۸	۱۵۳۲۱۵۴۲	۸۶۷	۱۹.۹۷	۴۱.۶	سیتوپلاسم
Glyma.08G189800	<i>GmLOX12</i>	Chr08	۱۵۳۳۰۵۳۹	۱۵۳۳۵۷۰۳	۸۶۹	۱۵.۹۷	۴۴.۷	سیتوپلاسم
Glyma.10G153900	<i>GmLOX13</i>	Chr10	۳۹۰۵۰۷۷۲	۳۹۰۵۷۱۱۷	۸۶۶	۱۷.۹۸	۷۵.۵	سیتوپلاسم
Glyma.11G130200	<i>GmLOX14</i>	Chr11	۹۸۷۷۷۰۹	۹۸۸۶۹۱۵	۹۰۷	۸۲.۱۰۳	۳۸.۷	کلروپلاست
Glyma.11G130300	<i>GmLOX15</i>	Chr11	۹۸۹۸۹۰۳	۹۹۱۰۰۳۵	۹۰۲	۶۴.۱۰۲	۰۲.۶	کلروپلاست
Glyma.12G054700	<i>GmLOX16</i>	Chr12	۳۹۳۵۹۵۲	۳۹۴۳۸۶۷	۹۱۵	۴۳.۱۰۴	۶۴.۷	کلروپلاست
Glyma.13G030300	<i>GmLOX17</i>	Chr13	۸۸۳۵۸۴۲	۸۸۴۲۵۸۶	۹۱۹	۳۲.۱۰۴	۸.۶	کلروپلاست
Glyma.13G075900	<i>GmLOX18</i>	Chr13	۱۶۹۹۲۸۷۲	۱۷۰۰۳۲۶۵	۹۲۸	۷۲.۱۰۶	۵۴.۷	کلروپلاست
Glyma.13G347500	<i>GmLOX19</i>	Chr13	۴۳۱۲۸۱۴۰	۴۳۱۳۲۶۶۶	۸۶۷	۲۹.۹۷	۶۶.۶	سیتوپلاسم
Glyma.13G347600	<i>GmLOX20</i>	Chr13	۴۳۱۳۵۵۵۷	۴۳۱۳۹۹۰۵	۸۵۳	۸۱.۹۵	۲۹.۶	سیتوپلاسم
Glyma.13G347700	<i>GmLOX21</i>	Chr13	۴۳۱۴۰۰۴۲	۴۳۱۴۶۹۲۰	۸۵۴	۴۷.۹۶	۹۸.۵	سیتوپلاسم
Glyma.13G347800	<i>GmLOX22</i>	Chr13	۴۳۱۶۴۳۰۰	۴۳۱۷۱۵۲۴	۹۸۰	۶۲.۱۱۰	۳۶.۶	سیتوپلاسم
Glyma.15G026300	<i>GmLOX23</i>	Chr15	۲۱۲۳۶۱۵	۲۱۲۸۲۶۴	۸۶۲	۲۵.۹۷	۶۲.۶	سیتوپلاسم
Glyma.15G026400	<i>GmLOX24</i>	Chr15	۲۱۳۰۶۰۲	۲۱۳۴۷۷۸	۸۵۷	۳۹.۹۶	۸۱.۶	سیتوپلاسم
Glyma.15G026500	<i>GmLOX25</i>	Chr15	۲۱۴۲۳۵۹	۲۱۴۷۶۶۴	۸۵۴	۶۵.۹۶	۰۳.۶	سیتوپلاسم
Glyma.16G008700	<i>GmLOX26</i>	Chr16	۷۳۵۲۶۶	۷۴۳۳۱۲	۹۲۳	۰۳.۱۰۴	۳۸.۷	سیتوپلاسم
Glyma.16G082600	<i>GmLOX27</i>	Chr16	۹۱۶۸۳۷۸	۹۱۷۸۶۸۲	۸۶۷	۷۱.۹۹	۸۱.۸	سیتوپلاسم
Glyma.19G263300	<i>GmLOX28</i>	Chr19	۵۱۱۱۷۶۲۰	۵۱۱۲۲۲۸۷	۹۰۰	۴۷.۱۰۱	۷۸.۷	سیتوپلاسم
Glyma.20G053700	<i>GmLOX29</i>	Chr20	۱۲۳۲۵۷۸۲	۱۲۳۳۴۵۳۴	۸۶۰	۲۷.۹۷	۸۸.۵	کلروپلاست
Glyma.20G054000	<i>GmLOX30</i>	Chr20	۱۲۳۹۵۹۹۱	۱۲۴۰۸۲۶۴	۹۰۴	۸۳.۱۰۲	۳۱.۶	سیتوپلاسم
Glyma.20G054100	<i>GmLOX31</i>	Chr20	۱۲۴۷۰۸۹۴	۱۲۴۷۷۳۸۴	۸۶۱	۸۹.۹۷	۹۹.۵	کلروپلاست
Glyma.20G144600	<i>GmLOX32</i>	Chr20	۲۸۳۰۲۵۹۸	۲۸۳۱۰۷۸۴	۸۵۹	۹۵.۹۷	۶۸.۶	کلروپلاست

نشان داده است که در گیاهان بسیاری از ژن‌های کلاستر در پاسخ به تنش‌ها و یا بیوستنتر متابولیت‌های ثانویه نقش دارند لذا می‌توان گفت که ژن‌های LOX نیز می‌توانند در این فرآیندهای زیستی نقش داشته‌باشند ( Polturak & Osbourn, 2021). از سوی دیگر بر اساس مطالعات پیشین،

تعداد ژن‌ها موجود بر روی برخی از کروموزوم‌ها و ترتیب قرارگیری و فاصله آن‌ها مانند ژن‌های موجود بر روی کروموزوم‌های ۵ و ۷ نخود و یا کروموزوم ۸ یونجه یکساله نشان‌دهنده کلاستر بودن ژن‌ها LOX در این مناطق ژنومی و احتمال ایجاد این کلاستر در اثر مضاعف‌شدگی تاندوم می‌باشد (جدول ۱). مطالعات

خانواده ژنی *LOX* شامل ۱۳ ژن در ذرت، ۶ ژن در آرابیدوپسیس، ۱۴ ژن در برنج، ۱۲ ژن در ارزن، ۱۱ ژن در چای، ۳۳ ژن در کلزا و ۲۱ ژن در پنبه می‌باشد. این تفاوت نشان‌دهنده این امر است که علی‌رغم کارکرد بیوشیمیایی مشابه این ژن‌ها، مسیر تکاملی آن‌ها احتمالاً متفاوت می‌باشد (Feussner & Wasternack, 2002). از این گیاهان اشاره شده بزرگ‌ترین خانواده *LOX* به ترتیب مربوط به کلزا، سویا و پنبه می‌باشد. این سه گیاه از نظر ژنومی پلی‌پلوئیدی می‌باشند. از سوی دیگر رابطه معنی‌داری بین اندازه این خانواده ژنی و اندازه ژنوم مشاهده نمی‌شود. به عنوان مثال اندازه ژنومی برنج و ارزن به ترتیب ۵۰۰ و ۴۹۰ مگابایت باز و اندازه ژنوم ذرت ۲/۴ گیگابایت باز می‌باشد (<http://plants.ensembl.org/index.html>). با این حال تعداد ژن‌های *LOX* این سه گیاه تفاوت معنی‌داری نداشته و لذا پلی‌پلوئیدی عامل مؤثر در بسط این خانواده ژنی در کلزا، سویا و پنبه می‌باشد.

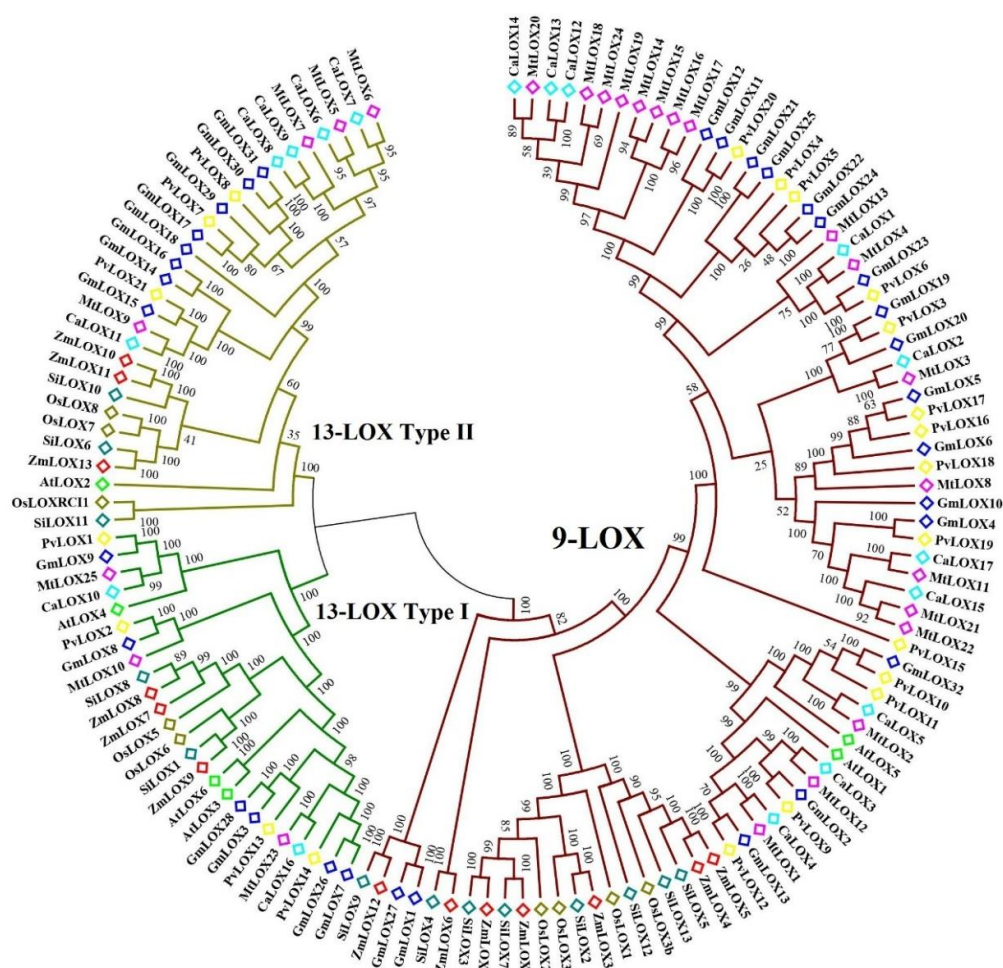
#### مطالعه رابطه تکاملی ژن‌های *LOX*

جهت بررسی روابط تکاملی و تعیین گروه‌بندی ژن‌های *LOX*، درخت فیلوژنتیکی بر مبنای نزدیک‌ترین همسایه‌ها و با ۱۰۰۰ تکرار آزمون بوت‌استرپ رسم شد. بدین منظور ۱۳۶ توالی پروتئین *LOX* مربوط به برنج (C3)، ذرت (C4) و ارزن (C4) از گیاهان تک‌لپه و سویا، نخود، لوبیا، یونجه یکساله و آرابیدوپسیس از گیاهان دو لپه استفاده شد (شکل ۱). استفاده از گیاهان گونه‌های مختلف تک‌لپه و دو لپه موجب افزایش دقت گروه‌بندی‌ها و همچنین افزایش درک ما از نحوه تکامل ژن‌های *LOX* می‌شود. همان‌گونه که مطالعه این خانواده در سایر گیاهان نشان داده بود، در درخت فیلوژنتیکی رسم شده ژن‌های *LOX* به دو گروه 9-*LOX* و 13-*LOX* تقسیم شدند (Liu et al., 2021; Kang et al., 2021). گروه 13-*LOX* به نوبه خود در دو زیر گروه تیپ یک و دو قرار گرفتند. در گروه 9-

لپه داشته‌باشد (Chen et al., 2014). مطالعه رابطه تکاملی ژن‌ها می‌تواند در پیش‌بینی نقش زیستی آن‌ها مؤثر باشد زیرا از نظر تکاملی، انشقاق ژن‌ها در درخت فیلوژنتیکی نشان‌دهنده انشقاق در نقش کارکردی آن‌ها بوده و از سوی دیگر ژن‌های یک کلاستر احتمالاً کارکرد مشابه دارند (Zhu et al., 2018). مطالعات نشان داده است که ژن‌های *AtLOX1* و *AtLOX5* نقش مهمی در پاسخ آرابیدوپسیس به تنش‌ها دارند. ژن *AtLOX1* در مسیر بیوستتاز JA و سایر اکتانودکانوئیک‌ها<sup>۱</sup> در پاسخ به پاتوژن‌ها نقش دارد (Zheng et al., 2007). از سوی دیگر *AtLOX5* در نمو ریشه جانبی و پاسخ دفاعی آرابیدوپسیس دارای نقش کلیدی است (Vellosillo et al., 2007).

جهش‌یافته‌های *lox1* و *lox5* باعث کاهش مقاومت آرابیدوپسیس به تنش‌ها و افزایش محتوای مالون‌دی‌آلدئید می‌شوند (Bannenberg et al., 2009).





شکل ۱. درخت فیلوژنتیکی خانواده ژنی LOX در نخود، لوبیا، یونجه یکساله، سویا، آرابیدوپسیس، برنج، ذرت و ارزن. رسم درخت بر اساس طول کامل پروتئین‌ها و الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه‌ها و آزمون بوت‌استرپ با ۱۰۰۰ تکرار. گروه‌های مختلف و نیز ژن‌های مربوط به هر گیاه با رنگ مجزا نشان داده شده‌اند. رسم درخت، ویرایش و رنگ‌بندی آن با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 انجام شد.

### ویژگی‌های پروتئینی، دمین‌های حفاظت‌شده و ساختار ژنی

ویژگی‌های عمومی پروتئین‌های کد شده به‌وسیله خانواده‌های ژنی شامل وزن مولکولی، طول پروتئین، نقطه ایزوالکتریک و جایگاه سلولی از نظر تکاملی و گروه‌بندی آن‌ها حائز اهمیت هستند. آنالیزهای انجام‌گرفته در مورد پروتئین‌های LOX نخود، لوبیا، سویا و یونجه یکساله نشان‌دهنده حفاظت شدگی بالای این آنزیم‌ها می‌باشد. در نخود میانگین طول پروتئین ۸۶۶ اسید آمینه (بین ۷۷۹ تا ۹۸۵)، وزن مولکولی ۹۸/۳ کیلو دالتون (بین ۸۹/۲۹ تا ۱۰۹/۴۴)

ژن‌های *PvLOX11*, *PvLOX10*, *GmLOX9* و *CaLOX5* دارای رابطه تکاملی نزدیک با *AtLOX5* هستند (شکل ۱). از سوی دیگر ژن‌های *GmLOX2*, *MtLOX12*, *CaLOX3*, *GmLOX13*, *MtLOX1*, *CaLOX4*, *PvLOX9* و *PvLOX12* در یک کلاستر همراه با ژن *AtLOX1* قرار دارند (شکل ۱). با توجه به نقش ژن‌ها در آرابیدوپسیس می‌توان گفت که ژن‌های همگروه آن‌ها ممکن است در بیوسنتز JA و پاسخ به تنش نقش داشته باشند. با این حال جزئیات نقش کارکردی آن‌ها نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

ویژه با کارکرد مهم بیولوژیکی نظیر اتصال سوبسترا یا کوفاکتور می‌باشند (Nahirñak *et al.*, 2016). بر این اساس ۲۰ موتیف حفاظت‌شده با طول بین ۱۸ تا ۵۰ اسید آمینه شناسایی شد. موتیف‌های یک تا هشت، موتیف ۱۰ و موتیف‌های ۱۲ تا ۱۷ در همه ۹۵ توالی پروتئینی شناسایی شد. همچنین موتیف‌های ۹ و ۱۱ در ۹۴ توالی و موتیف‌های ۱۸، ۱۹ و ۲۰ به ترتیب در ۹۳، ۸۹ و ۳۶ توالی شناسایی شدند (جدول ۲).

نتایج نشان‌دهنده حفاظت‌شدگی بالای این پروتئین‌ها می‌باشد. موتیف شماره یک دارای یک توالی ۳۶ اسیدآمینه‌ای به صورت His-(X)4-His-(X)4-His-(X)17-His-(X)18-His است که نقش مهمی در اتصال آهن و پایداری و فعالیت آنزیم داشته و دارای شش اسیدآمینه هیستیدین حفاظت‌شده می‌باشد (شکل ۲) (Shaban *et al.*, 2018). همچنین موتیف‌های شماره دو و پنج به ترتیب دارای بخش‌های اتصال به اکسیژن و اتصال سوبسترا می‌باشند (شکل ۲) که نقش مهمی در فعالیت کاتالیتیکی لیپواکسیژناز دارند (Padilla *et al.*, 2012).

مطالعه ساختار ژنی شامل تعداد اگزون و اینترون و همچنین فاز اینترونی می‌تواند اطلاعات ارزشی را در مورد مسیر تکاملی و ویژگی‌های هر خانواده ژنی ارائه دهد. مقایسه طول ژن‌های LOX در این چهار گیاه نشان می‌دهد که بلندترین ژن‌ها شامل *GmLOX27* و *GmLOX30* می‌باشد که به ترتیب ۱۱ و ۱۲ هزار جفت باز طول دارند. دلیل اصلی طول بلند این ژن‌ها وجود اینترون‌های بلند در آن‌ها می‌باشد. مطالعه ساختار ژنی خانواده LOX نشان داد تعداد اینترون‌ها و طول اگزون‌ها در هر دو گروه LOX-13 و LOX-9 مشابه می‌باشد و این ژن‌ها عموماً دارای هشت اینترون هستند. البته ژن‌های *MtLOX8* و *GmLOX28* دارای شش اینترون و ژن‌های *GmLOX22*، *MtLOX13* و *CaLOX3* دارای نه اینترون می‌باشند (شکل‌های ۳ و ۴). مطالعه ساختار ژنی

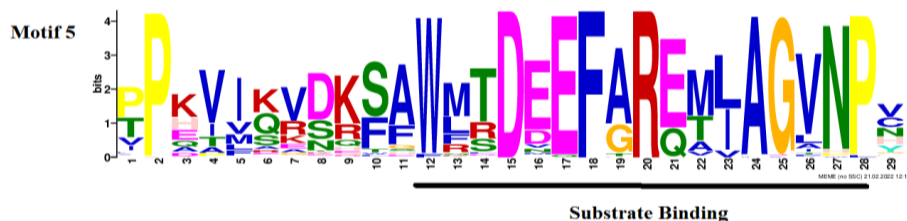
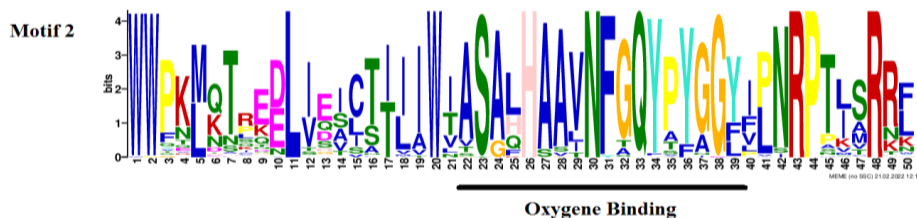
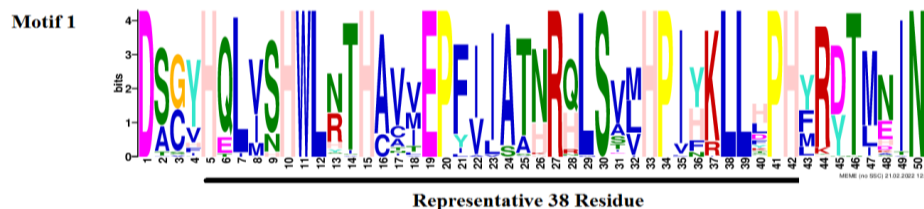
و نقطه ایزوالکتریک ۶/۳ (بین ۵/۴۱ تا ۸/۵۴) می‌باشد (جدول ۱). در لوبیا طول پروتئین، وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک به ترتیب ۸۷۰ اسیدآمینه (بین ۸۳۰ تا ۹۲۰)، ۹۸/۴ کیلو دالتون (بین ۹۳/۹۷ تا ۱۰۳/۵۴) و ۶/۹ (بین ۶/۰۸ تا ۹/۲۲) می‌باشد. در یونجه یکساله و سویا طول پروتئین به ترتیب ۸۷۴ (بین ۸۲۹ تا ۹۲۸) و ۸۸۵ (بین ۸۵۳ تا ۹۸۰) اسیدآمینه، وزن مولکولی ۹۸/۸ (بین ۹۴/۷۴ تا ۱۰۴/۸۲) و ۱۰۰ (۹۵/۸۱ تا ۱۱۰/۶۲) کیلو دالتون و در نهایت نقطه ایزوالکتریک ۶/۵ (۵/۱۶ تا ۷/۹۴) و ۶/۸ (۵/۷۵ تا ۹/۰۴) است. بررسی جایگاه سلولی پروتئین‌های LOX نشان داد که تمامی اعضا گروه LOX-13 تیپ دو در کلروپلاست فعال هستند (جدول ۱). همچنین محل فعالیت تمامی ژن‌های گروه 13-LOX تیپ یک و اکثر ژن‌های گروه LOX-9 سیتوپلاسم پیش‌بینی شد. در گروه LOX-9 جایگاه سلولی محصول ژن‌های *CaLOX4*، *CaLOX5*، *PvLOX11*، *MtLOX2* و *MtLOX12* کلروپلاست تعیین شد (جدول ۱). نتایج مشاهده‌شده در مورد جایگاه سلولی گروه LOX-13 کاملاً با نتایج سایر مطالعات هماهنگ می‌باشد. اما مطالعات نشان داده‌است که در گروه LOX-9 مکان فعالیت آنزیم‌ها سیتوپلاسم می‌باشد در حالی که در این مطالعه محل فعالیت برخی اعضا این گروه کلروپلاست پیش‌بینی شد. در مطالعه‌ای که روی خانواده ژنی LOX در درخت هلو انجام گرفت مشاهده‌شده که چنین حالتی وجود داشته و برخی از اعضا هر یک از گروه‌ها در جایگاه‌های سلولی متفاوت فعال هستند. وجود چنین پدیده‌ای می‌تواند بر اثر مضاعف‌شدگی‌های کروموزومی و تاریخچه تکاملی آن خانواده ژنی باشد (Guo *et al.*, 2017). به‌منظور آنالیز بهتر و مشخص کردن تفاوت‌های ساختاری و میزان تشابه و تفاوت توالی پروتئین‌های LOX بقولات از سرور MEME استفاده شد. موتیف‌ها عموماً دارای اسیدهای آمینه و توالی‌های

چهار تا نه، در کلزا شش تا ۱۱ و در فلفل هفت تا هشت عدد گزارش شده است (Sarde *et al.*, 2018; Shaban *et al.*, 2018; Kang *et al.*, 2021).

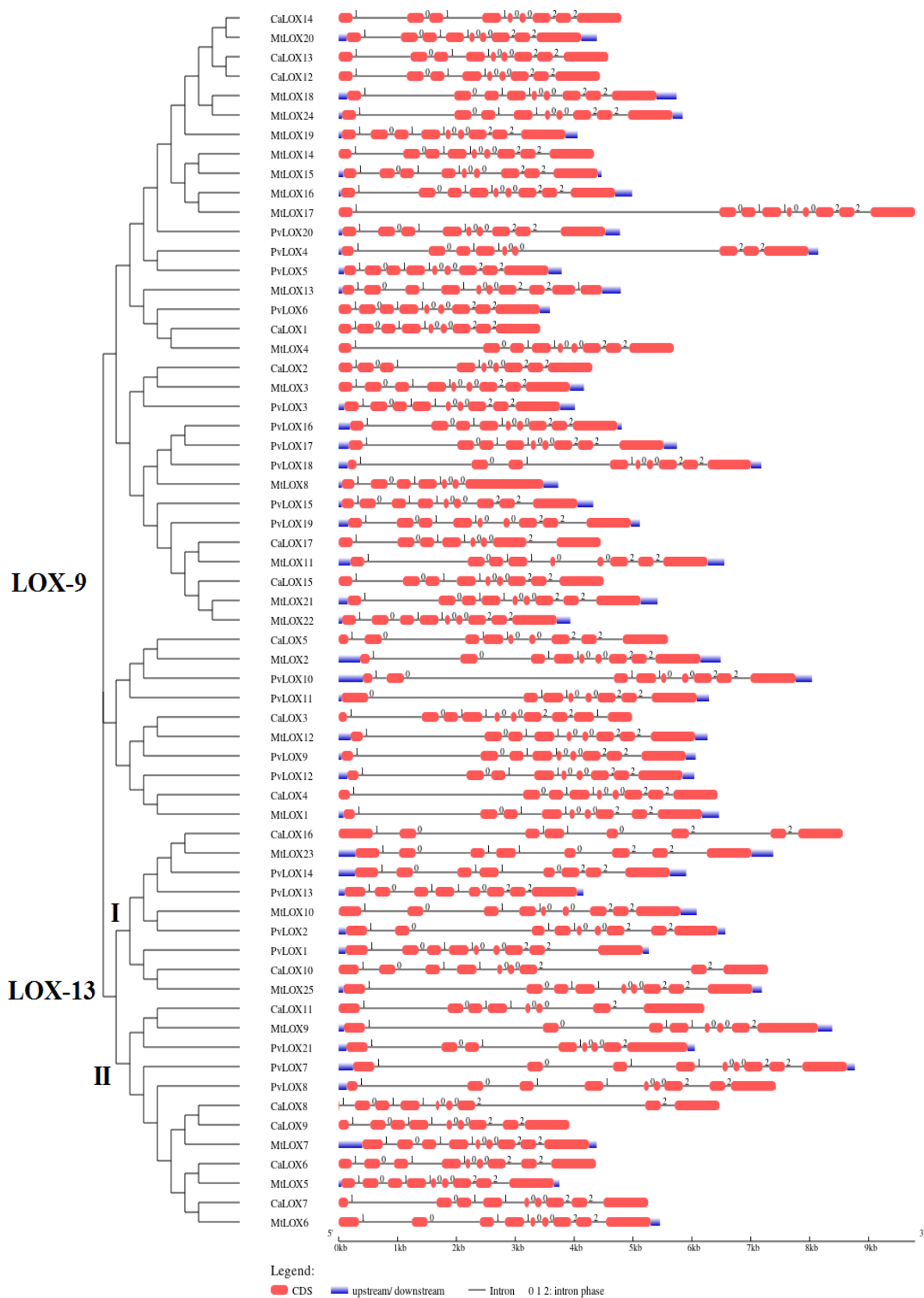
خانواده LOX در سایر گونه‌ها نیز نشان‌دهنده غنی‌بودن این خانواده ژنی از نظر ایترون است. به‌عنوان مثال تعداد ایترون در ژن‌های LOX پنبه

جدول ۲. موتیف‌های حفاظت‌شده شناسایی شده در خانواده ژنی LOX و مشخصات آن‌ها

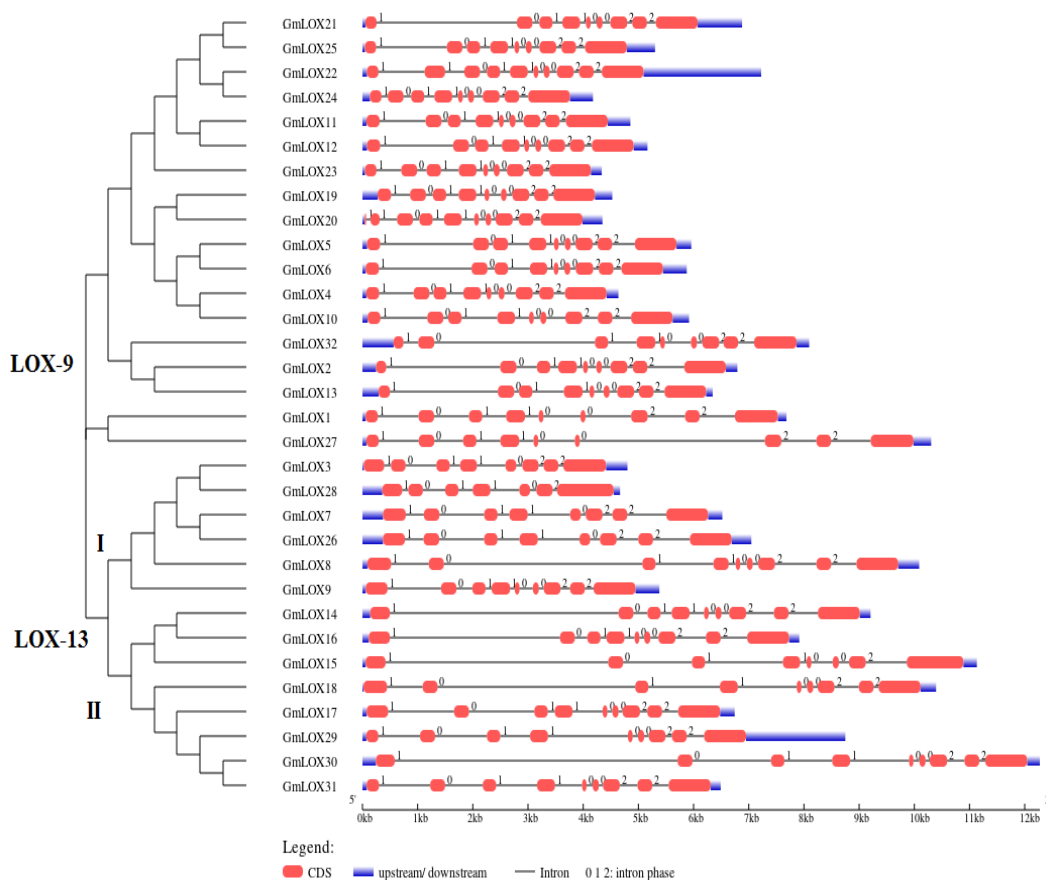
شماره موتیف	E-value	فراوانی	طول	توالی دمین
Motif 1	۴۳۴۷e-۰.۱	۹۵	۵۰	DSGYHQLVSHWLNTHAVVEPFIATNRQLSVLHPIYKLLHPHYRDTMNIN
Motif 2	۳۸۰۵e-۰.۳	۹۵	۵۰	WWPKMQTREDLIEICTIJIWIASALHAAVNFQYYPYGGYIPNRPTJSRRF
Motif 3	۲۵۰۱e-۸.۳	۹۵	۳۳	LRLIEDYPYAVDGLIEWDAIKTWVQEYVNFYY
Motif 4	۲۰۶۰e-۲.۶	۹۵	۳۲	RIFFANKTYLPSETPAPLVKYREEELKNLRGD
Motif 5	۱۹۳۰e-۲.۴	۹۵	۲۹	PPKVIKVDKSAWMTDEEFAREMJAGVNPV
Motif 6	۱۹۷۰e-۵.۲	۹۵	۲۹	TKAYATRTILFLTDDGTLKPLAIELSLPH
Motif 7	۱۷۶۹e-۴.۵	۹۵	۲۵	GTGERKEWDRIYDYDVYNDLGBPKD
Motif 8	۱۹۹۷e-۳.۲	۹۵	۳۳	ALARQSLINAGGIIESTFLPGKYSMEMSSVAY
Motif 9	۱۹۵۷e-۵.۴	۹۴	۲۹	KDWVFDQALPADLIKRGMAVEDPSSPHG
Motif 10	۱۱۶۰e-۶.۱	۹۵	۲۱	PASEGVEAWIWLAKAYVVVN
Motif 11	۱۱۱۲e-۲.۴	۹۴	۱۸	SSTYPYPRRGRTRGRKPTK
Motif 12	۱۳۹۸e-۳.۳	۹۵	۲۱	DSELQAWWKEIVEVGHGDLKB
Motif 13	۹۷۸e-۵.۴	۹۵	۱۸	FGIPGAFYIKNFHQKEFF
Motif 14	۱۵۲۸e-۲.۷	۹۵	۳۱	WTSDAEILEAFKRFKGLKEIEGKIDSRNND
Motif 15	۲۸۳۷e-۶.۱	۹۵	۵۰	KGTPEYEELVKBPZKAYLKTITSLKQALIDLSVIEILSRHSSDEEYLGZR
Motif 16	۱۵۰۱e-۹.۱	۹۵	۲۶	AIQEKLFILDYHDALLPYLRINAT
Motif 17	۱۸۰۳e-۵.۸	۹۵	۲۶	YVPRDEAFGLKSSDFLTYGKSVSQNVJPSLESAL
Motif 18	۱۱۶۴e-۰.۲	۹۳	۲۱	ESLRNRNGPVKMPYTLYPSS
Motif 19	۱۵۹۰e-۹.۲	۸۹	۲۹	IRLLQEFPPKSLDPQIYGDQTSTITKEH
Motif 20	۱۱۴۹e-۶.۱	۳۶	۵۰	DLNFTPPEFDSFDDVRSLEYEGGIKLPBILSKISPJPVFKEJFRDTGEQV



شکل ۲. برخی دمین‌های کارکردی شناسایی شده در خانواده ژنی LOX. میزان حفاظت‌شدگی هر اسید آمینه بر اساس اندازه آن مشخص شده است.



شکل ۳. ساختار ژنی آگزون-اینترونی خانواده ژنی LOX در نخود، لوبیا و یونجه یکساله. نواحی غیر کدکننده، آگزون‌ها و اینترون‌ها به ترتیب با رنگ آبی، قرمز و سیاه نشان داده شده‌اند.



شکل ۴. ساختار ژنی آگزون- اینترونی خانواده ژنی LOX در سویا. نواحی غیر کدکننده، آگزون‌ها و اینترون‌ها به ترتیب با رنگ آبی، قرمز و سیاه نشان داده شده‌اند.

(شکل‌های ۳ و ۴). با این حال در برخی از ژن‌ها تفاوت‌هایی مشاهده شد. در ژن‌های *GmLOX3*، *GmLOX7*، *GmLOX26*، *CaLOX16*، *MtLOX23*، *PvLOX14* و *PvLOX13* الگوی فاز اینترونی به صورت ۱۰۱۱۰۲۲ می‌باشد. چهار ژن *GmLOX15*، *CaLOX11*، *MtLOX9* و *MtLOX21* به صورت ۱۰۱۱۰۰۲ است. همچنین ژن *GmLOX22* دارای الگوی ۱۱۰۱۱۰۰۲۲، ژن *GmLOX28* دارای الگوی ۱۰۱۱۰۲، ژن *MtLOX13* دارای الگوی ۱۰۱۱۰۰۲۲۱، ژن *MtLOX8* دارای الگوی ۱۰۱۱۰۰، ژن *PvLOX11* دارای الگوی ۰۱۱۰۰۲۲ و ژن *CaLOX3* دارای الگوی ۱۰۱۱۰۰۲۲۱ می‌باشند (شکل‌های ۳ و ۴). وجود تفاوت مشاهده شده در تعداد و فاز اینترون

فاز اینترون به سه نوع، صفر، یک و دو تقسیم می‌شود که به ترتیب به درج یک اینترون بین دو کدون متوالی، بین باز اول و دوم کدون و بین باز دوم و سوم یک کدون اشاره دارد (ون و همکاران، ۲۰۲۱). توزیع فاز اینترون در طی تکامل، حفاظت شده و ناهمگن بوده و بیشترین فراوانی و حفاظت شدگی به ترتیب برای فازهای صفر، یک و دو مشاهده شده است (نگوئن و همکاران، ۲۰۰۶). در این مطالعه مشخص شد که فراوانی فازهای صفر، یک و دو به ترتیب ۳۶، ۳۸ و ۲۵ درصد می‌باشد. لذا می‌توان گفت که این خانواده ژنی دارای حفاظت شدگی بالایی از نظر ساختار ژنی در طی تکامل می‌باشند. مطالعه فاز اینترونی ژن‌های LOX نشان داد که الگوی غالب برای این ژن‌ها ۱۰۱۱۰۰۲۲ است

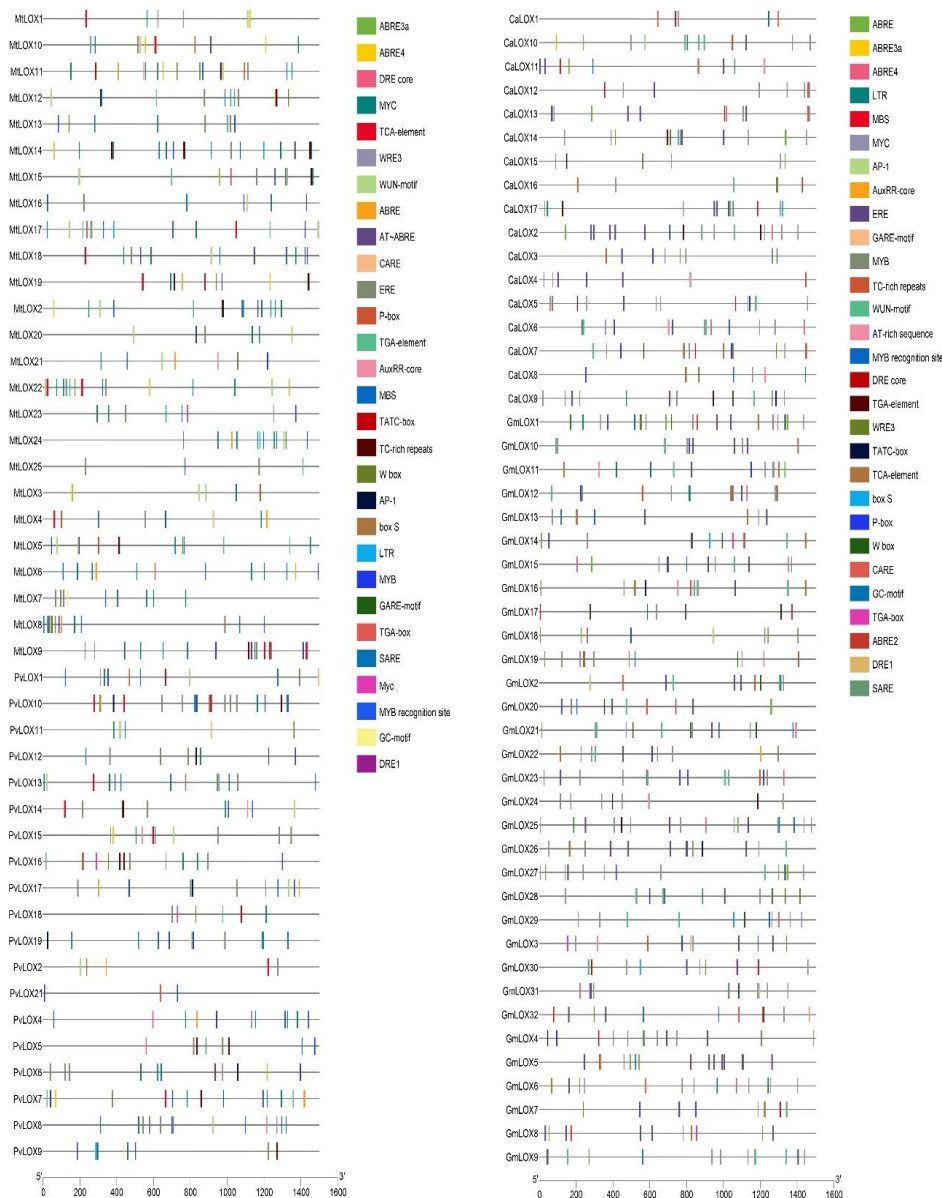
شامل پاسخ به ایسیاتور (AT-rich sequence)، WRE3، پاسخ به زخم و پاتوزن (W box, box S)، WUn-motif، پاسخ به خشکی (DRE core)، MYB، MBS، DRE1، MYB recognition، MYC، پاسخ به کادمیوم (AP-1)، پاسخ به سرما (LTR)، پاسخ به استرس (TC-rich repeats) و پاسخ به anoxic (GC-motif) می‌باشد (شکل ۵). بیشترین فراوانی عناصر تنظیمی پاسخ به تنش‌ها مربوط به MYB و MYC است که به ترتیب ۲۵۵ و ۱۱۷ موتیف مربوط به این عناصر در پروموتور ژن‌های LOX شناسایی شده است. هورمون‌های جاسمونیک اسید، سالیسیلیک اسید و اتیلن سه هورمون اصلی در پاسخ به تنش‌های زیستی می‌باشند. وجود سیس المنت‌های پاسخ به هورمون‌ها و تنش‌های زیستی نظیر ایسیاتورها، پاتوزن‌ها و زخم‌ها در پروموتور ژن‌های LOX نشان‌دهنده نقش آن‌ها در پاسخ به تنش‌های زیستی است (Liu et al., 2020; Li et al., 2019). همچنین وجود عناصر تنظیمی پاسخ به تنش‌های غیرزیستی حاکی از نقش این ژن‌ها در پاسخ به این تنش‌ها می‌باشد. به‌عنوان مثال مشخص شده است که بیان ژن‌های LOX گوجه‌فرنگی در پاسخ به تنش‌های شوری، سرما و خشکی القاء می‌شوند (Upadhyay et al., 2019). از مهم‌ترین مولکول‌های پیام‌رسان که طیف وسیعی از پاسخ‌های گیاهی به تنش‌ها را تنظیم می‌کند مولکول‌های miRNA هستند که مربوط به کلاس RNAهای غیر کدکننده بوده و در تنظیم بیان پس از رونویسی ژن‌ها نقش دارند. در واقع مولکول‌های miRNA مولکول‌های غیر کدکننده با طول ۲۰ تا ۲۴ نوکلئوتیدی بوده و از طریق ممانعت از ترجمه و یا برش رونوشت ژن‌های هدف نقش خود را ایفا می‌کنند (Singh et al., 2021). با توجه به اهمیت این مولکول‌های تنظیمی، نقش آن‌ها در تنظیم بیان ژن‌های LOX مطالعه شد.

برخی از ژن‌های LOX می‌تواند به دلیل حذف یا به‌دست‌آوردن اینترون در طی تکامل بوده و احتمالاً موجب ایجاد یک نقش کارکردی اختصاصی برای آن‌ها شده است (Liu et al., 2020). از سوی دیگر نتایج نشان داد که بسیاری از ژن‌های LOX دارای ساختار ژنی و فاز اینترونی مشابه هستند. بر این اساس می‌توان گفت که این ژن‌ها دارای کارکرد مشابه می‌باشند (Paterson et al., 2006).

### مطالعه *in silico* ناحیه پروموتوری و شناسایی مولکول‌های miRNA مؤثر ژن‌های LOX

در موجودات زنده بیان ژن در سطوح مختلف تنظیم می‌شود که در میان آن‌ها تنظیم در سطح رونویسی یک مکانیسم تنظیمی مهم می‌باشد (Liu et al., 2014). از جمله عوامل مؤثر در تنظیم رونویسی، عناصر تنظیمی سیس ناحیه پروموتوری ژن‌ها هستند که از طریق میانکنش با عوامل رونویسی در تنظیم بیان ژن‌ها در پاسخ به فرآیندهای زیستی مختلف نظیر پاسخ به تنش نقش اساسی ایفا می‌کنند (Lu et al., 2018). بر این اساس بخش پروموتور ژن‌های LOX نخود، لوبیا، سویا و یونجه یک‌ساله آنالیز و عناصر تنظیمی سیس پاسخ به تنش‌ها و هورمون‌ها شناسایی شد. نتایج نشان داد که ۲۹ نوع سیس المنت به تعداد ۱۰۸۸ عدد در پروموتور این ژن‌ها وجود دارد (شکل ۵). عناصر تنظیمی سیس پاسخ به هورمون‌ها شامل عناصر پاسخ به ABA (ABRE)، ABRE3a، AT-ABRE، پاسخ به جیبرلین (TATC-box، P-box، GARE)، پاسخ به سالیسیلیک اسید (SARE، TCA-element)، پاسخ به اتیلن (ERE)، پاسخ به اکسین (TGA-box، TGA-element، AuxRR-core) و پاسخ همزمان به جیبرلین و ABA (CARE) می‌باشد. بیشترین تعداد عنصر تنظیمی پاسخ به هورمون مربوط به سیس المنت ERE با فراوانی ۱۷۲ است. عناصر تنظیمی پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی





شکل ۵. عناصر تنظیمی شناسایی شده در پروموتور ژن‌های LOX نخود، لوبیا، سویا و یونجه یکساله. هر عنصر تنظیمی و جایگاه آن بر روی پروموتور با یک رنگ متمایز نمایش داده شده‌است.

رونویسی ژن *MtLOX24* متأثر از ۱۰ نوع miRNA بوده و ژن‌های *MtLOX2*، *MtLOX3* و *MtLOX23* تحت تأثیر ۹ نوع miRNA قرار دارند. همچنین مولکول‌های *mtr-miR5289a* و *mtr-miR5554a-5p* مؤثرترین مولکول‌های miRNA در تنظیم بیان پس از رونویسی ژن‌های LOX یونجه یکساله بوده و به ترتیب بر روی پنج و هشت

نتایج نشان داد که در یونجه یکساله تمامی ژن‌های LOX تحت تنظیم پس از رونویسی به وسیله مولکول‌های miRNA هستند. از میان ژن‌های LOX یونجه یکساله، ژن *MtLOX14* بیشترین تأثیرپذیری را از مولکول‌های miRNA داشته و ۱۱ نوع miRNA توانایی تأثیر بر روی بیان این ژن را دارند. همچنین تنظیم پس از

مورد کارکرد آن‌ها باشد. مطالعات انجام‌گرفته نشان داده‌است که LOXها نقش اساسی در نمو و پاسخ به تنش‌ها ایفا می‌کنند (Wang et al., 2019). بر اساس الگوی بیان، ژن‌های *GmLOX* به چهار گروه تقسیم می‌شوند (شکل ۶). گروه یک شامل ژن‌های *GmLOX6*، *GmLOX15*، *GmLOX23*، *GmLOX19* و *GmLOX20* می‌باشد که در پاسخ به تنش‌های شوری و سرما بیان کمی داشته و در مقابل در شرایط خشکی و گرما بیان بالایی نشان می‌دهند. در واقع با توجه به میزان بیان می‌توان این ژن‌ها را اختصاصی تنش گرمایی نامید (شکل ۶).

ژن‌های *GmLOX1*، *GmLOX12*، *GmLOX18*، *GmLOX27*، *GmLOX29*، *GmLOX31*، *GmLOX2*، *GmLOX3* و *GmLOX28* که بیان آن‌ها در تمامی تنش‌ها پایین بوده، گروه دو را تشکیل داده‌اند. احتمالاً این ژن‌ها در شرایط زیستی و نموی متفاوتی بیان شده و لذا نقش کارکردی مهمی در پاسخ به تنش‌های مورد مطالعه ندارند (شکل ۶). الگوی بیانی گروه سوم نشان می‌دهد که این ژن‌ها عموماً بیان متوسطی در پاسخ به تنش‌ها دارند. این ژن‌ها شامل *GmLOX8*، *GmLOX10*، *GmLOX17*، *GmLOX13*، *GmLOX9*، *GmLOX30*، *GmLOX11* و *GmLOX32* می‌باشد (شکل ۶). گروه چهارم بر اساس الگوی بیان می‌تواند مهم‌ترین گروه از ژن‌های *GmLOX* را شامل باشد زیرا بیان این ژن‌ها در تمامی تنش‌های مورد مطالعه بالا بوده که می‌تواند نشان‌دهنده نقش مهم این ژن‌ها در پاسخ سویا به شوری، خشکی، سرما و گرما باشد. ژن‌های *GmLOX4*، *GmLOX21*، *GmLOX25*، *GmLOX5*، *GmLOX22*، *GmLOX24*، *GmLOX14*، *GmLOX16*، *GmLOX7* و *GmLOX26* در گروه چهارم قرار دارند (شکل ۶). همچنین مطالعه پروفایل بیانی ژن‌های *GmLOX* مشخص کرد که ژن‌های LOX-9 و LOX-13 در هر

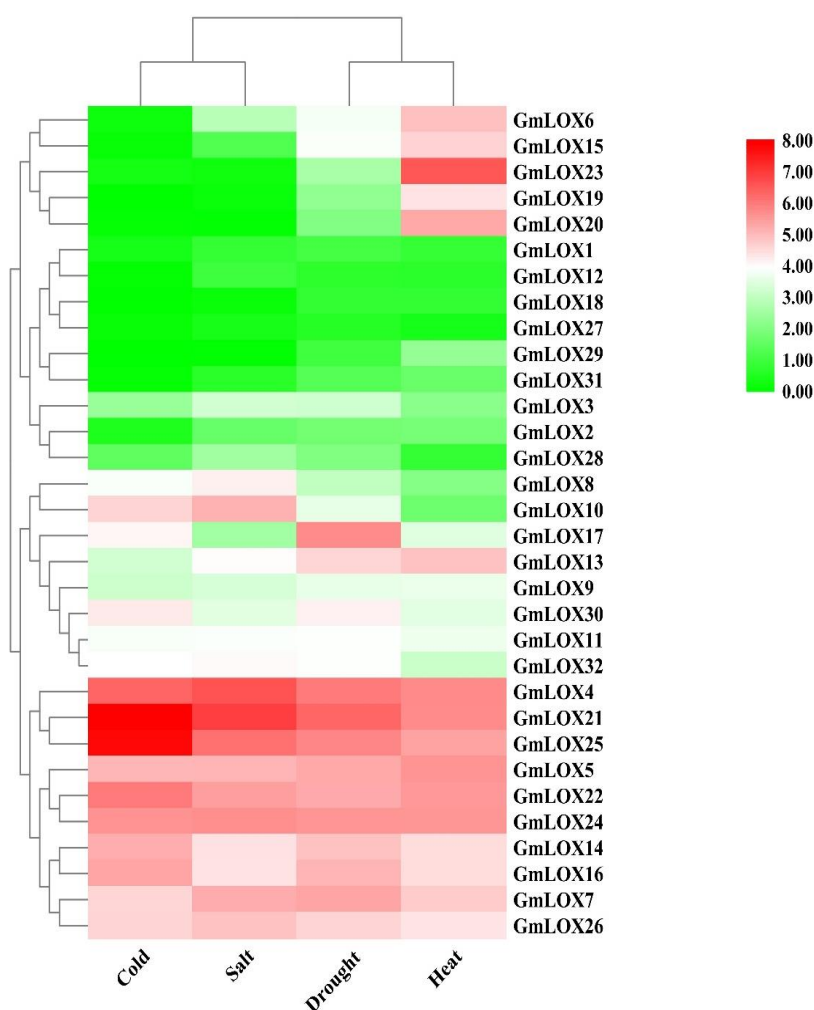
ژن مؤثر هستند که از طریق برش رونوشت ژن، نقش کارکردی خود را ایفا می‌کنند. بر اساس بررسی ژن‌های LOX سویا مشخص شد که به استثنا ژن *GmLOX21* سایر ژن‌های این خانواده تحت تأثیر مولکول‌های miRNA قرار دارند. چهار ژن *GmLOX3*، *GmLOX8*، *GmLOX17* و *GmLOX24* به ترتیب تحت تأثیر ۱۰، ۱۰، نه و هشت نوع مولکول miRNA قرار داشته و تنظیم بیان پس رونویسی نقش مهمی در تنظیم کارکرد آن‌ها دارد. همچنین مهم‌ترین مولکول‌های miRNA که ژن‌های LOX سویا را تحت تأثیر قرار می‌دهند شامل *gma-miR5780b*، *gma-miR396* و *miR5037* است که به ترتیب بر بیان پس از رونویسی پنج، شش و هفت ژن مؤثر هستند. مطالعه کارکردی مولکول *gma-miR396* نشان داده‌است که این miRNA از طریق میانکنش با ژن‌های GRF در افزایش عملکرد و نیز مقاومت سویا به تنش خشکی نقش دارد (Liu et al., 2017) با توجه به نبود اطلاعات کافی پایگاه داده *psRNA target* در مورد miRNA ای مربوط به لوبیا آنالیزهای نشان داد که فقط ژن *PvLOX1* متأثر از دو مولکول *pvu-miR319c* و *pvu-miR159a.1* می‌باشد. همچنین برای نخود داده‌ای یافت نشد. با توجه به عناصر تنظیمی سیس شناسایی شده در این ژن‌ها و همچنین تاثیرپذیری ژن‌های LOX از مولکول‌های miRNA می‌توان گفت که این نوع تنظیم بیان ژن‌های لیپواکسیژناز در گیاهان مورد مطالعه در سطح رونویسی و پس از رونویسی پیچیده بوده و نشان‌دهنده کارکردهای مختلف این ژن‌ها در پاسخ به فرآیندهای متفاوت زیستی می‌باشد.

پاسخ ژن‌های LOX سویا نسبت به تنش‌های غیرزیستی الگوی بیان ژن‌ها می‌تواند یک راهنمای مهم در



گرما نشان دهنده وجود هم‌پوشانی و در عین حال الگوی بیان اختصاصی آن‌ها بوده و این ژن‌ها از یک یکسو توانایی پاسخ به تنش‌های مختلف را هماهنگ با سایر ژن‌های LOX داشته و از سوی دیگر می‌توانند همانند ژن‌های گروه یک در پاسخ به یک تنش نقش اختصاصی ایفا کنند. مطالعه الگوی بیان ژن‌های خانواده LOX پنبه و ارزن نیز نشان دهنده القاء این ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های شوری و خشکی می‌باشد. این امر نشان می‌دهد که مکانیسم کارکردی LOX‌ها در پاسخ و سازگاری گیاهان مختلف به تنش‌ها مشابه می‌باشد (Shaban *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2021).

چهار گروه بیانی حضور دارند، به‌عنوان مثال گروه چهارم شامل شش ژن از LOX-13 و پنج ژن از LOX-9 می‌باشد. لذا هر دو گروه در پاسخ به تنش‌ها نقش کارکردی دارند. الگوی بیان ژن‌های *GmLOX* در پاسخ به چهار تنش مورد مطالعه نشان می‌دهد که بیان این ژن‌ها در طی تنش‌های شوری و سرما مشابه است. چنین الگویی در پاسخ به تنش‌های گرما و خشکی نیز مشاهده می‌شود که نشان دهنده وجود فرآیندهای زیستی مشابه در تعدیل اثرات منفی تنش‌ها می‌باشد. با توجه به این نتایج می‌توان گفت که الگوی بیان ژن‌های LOX سویا در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی شامل شوری، خشکی، سرما و



شکل ۶. نقشه حرارتی الگوی بیانی خانواده ژنی LOX سویا در پاسخ به تنش‌های شوری، خشکی، سرما و گرما، نوار راهنما شدت بیان ژن‌ها را نشان می‌دهد که از سبز برای بیان کم و قرمز برای بیان بالا می‌باشد.

## نتیجه‌گیری و پیشنهادات

و mtr-miR5554a-5p بر تنظیم بیان پس از رونویسی این ژن‌ها حاکی از تنظیم پیچیده بیان ژن‌های LOX در سطح رونویسی و پس از رونویسی بوده و دلالت بر تنوع کارکردی آن‌ها دارد. از سوی دیگر پروفایل بیانی ژن‌های *GmLOX* نشان داد که این ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های شوری، خشکی، سرما و گرما دارای الگوی بیانی متفاوتی بوده و این پاسخ می‌تواند اختصاصی بوده و یا با همکاری تعداد بیشتری از ژن‌های LOX باشد. نتایج این مطالعه اطلاعات ما در مورد خانواده ژنی LOX در بقولات را افزایش داده و می‌تواند مطالعات در زمینه تاریخچه تکاملی ژن‌های LOX و نیز استفاده از ژن‌های با بیان بالا و اختصاصی نظیر *GmLOX4*، *GmLOX5*، *GmLOX21*، *GmLOX22*، *GmLOX24*، *GmLOX14*، *GmLOX16*، *GmLOX7* و *GmLOX26* در تولید گیاهان تراریخته با هدف تولید گیاهان مقاوم به تنش‌ها را تسهیل نماید.

در این مطالعه اعضای خانواده ژنی LOX در برخی از گیاهان خانواده بقولات شامل نخود (۱۷ ژن)، لوبیا (۲۱ ژن)، یونجه یکساله (۲۵ ژن) و سویا (۳۳ ژن) شناسایی و از نظر تکاملی و کارکردی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان‌دهنده حفاظت شدگی بالای این ژن‌ها از نظر ساختار ژنی، دمین‌های حفاظت‌شده، فاز اینترون و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های کد شده به‌وسیله ژن‌های LOX می‌باشد. از نظر تکاملی همانند سایر گیاهان ژن‌های LOX بقولات به دو گروه 9-LOX و 13-LOX تقسیم شدند که تعداد اعضا تشکیل‌دهنده گروه 9-LOX بیشتر بود. مطالعه اگزون و اینترون نشان داد که این خانواده غنی از اینترون بوده و بین شش تا نه اینترون دارند. وجود عناصر تنظیمی پاسخ به تنش‌ها و هورمون‌ها با فراوانی متفاوت نظیر ERE، MYB و MYC در پروموتور ژن‌های LOX و همچنین تأثیر مولکول‌های miRNA نظیر gma-miR396، mtr-miR5289a

## REFERENCES

- Bannenberg, G., Martínez, M., Hamberg, M., & Castresana, C. (2009). Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids*, 44(2), 85-95.
- Banthiya, S., Kalms, J., Yoga, E. G., Ivanov, I., Carpena, X., Hamberg, M., Kuhn, H., & Scheerer, P. (2016). Structural and functional basis of phospholipid oxygenase activity of bacterial lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Biology of Lipids*, 1861(11), 1681-1692.
- Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H. R., Frank, M. H., He, Y., & Xia, R. (2020). TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular plant*, 13(8), 1194-1202.
- Chen, Z., Chen, X., Yan, H., Li, W., Li, Y., Cai, R., & Xiang, Y. (2015). The lipoxygenase gene family in poplar: identification, classification, and expression in response to MeJA treatment. *PLoS One*, 10(4), e0125526.
- Feussner, I., & Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual review of plant biology*, 53(1), 275-297.
- Guo, S., Song, Z., Ma, R., Yang, Y., & Yu, M. (2017). Genome-wide identification and expression analysis of the lipoxygenase gene family during peach fruit ripening under different postharvest treatments. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(5), 1-10.
- Kang, Y., Liu, W., Guan, C., Guan, M., & He, X. (2021). Evolution and

- functional diversity of lipoxygenase (LOX) genes in allotetraploid rapeseed (*Brassica napus* L.). *International Journal of Biological Macromolecules*, 188, 844-854.
- Kotapati, K. V., Palaka, B. K., & Ampasala, D. R. (2017). Alleviation of nickel toxicity in finger millet (*Eleusine coracana* L.) germinating seedlings by exogenous application of salicylic acid and nitric oxide. *The Crop Journal*, 5(3), 240-250.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Li, M., Li, L., Dunwell, J. M., Qiao, X., Liu, X., & Zhang, S. (2014). Characterization of the lipoxygenase (LOX) gene family in the Chinese white pear (*Pyrus bretschneideri*) and comparison with other members of the Rosaceae. *BMC genomics*, 15(1), 1-12.
- Li, N., Han, X., Feng, D., Yuan, D., & Huang, L. J. (2019). signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/jasmonate in plant defense: do we understand what they are whispering? *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 671.
- Lim, C. W., Han, S.-W., Hwang, I. S., Kim, D. S., Hwang, B. K., & Lee, S. C. (2015). The pepper lipoxygenase CaLOX1 plays a role in osmotic, drought and high salinity stress response. *Plant Cell Physiology*, 56(5), 930-942.
- Liu, F., Li, H., Wu, J., Wang, B., Tian, N., Liu, J., Sun, X., Wu, H., Huang, Y., Lü, P., & Lü, P. (2021). Genome-wide identification and expression pattern analysis of lipoxygenase gene family in banana. *Scientific reports*, 11(1), 1-19.
- Liu, J., Zhou, Y., Li, J., Wang, F., & Yang, Y. (2020). Comprehensive genomic characterization and expression analysis of the lipoxygenase gene family in watermelon under hormonal treatments. *Agriculture*, 10(10), 429.
- Liu, J.-H., Peng, T., & Dai, W. (2014). Critical cis-acting elements and interacting transcription factors: key players associated with abiotic stress responses in plants. *Plant molecular biology reporter*, 32(2), 303-317.
- Lu, Z., Ricci, W. A., Schmitz, R. J., & Zhang, X. (2018). Identification of cis-regulatory elements by chromatin structure. *Current opinion in plant biology*, 42, 90-94.
- Nahirñak, V., Rivarola, M., Gonzalez de Urreta, M., Paniego, N., Hopp, H. E., Almasia, N. I., & Vazquez-Rovere, C. (2016). Genome-wide analysis of the Snakin/GASA gene family in *Solanum Tuberosum* cv. Kennebec. *American journal of potato research*, 93(2), 172-188.
- Nguyen, H. D., Yoshihama, M., & Kenmochi, N. (2006). Phase distribution of spliceosomal introns: implications for intron origin. *BMC evolutionary biology*, 6(1), 1-9.
- Padilla, M. N., Hernández, M. L., Sanz, C., & Martínez-Rivas, J. M. (2012). Molecular cloning, functional characterization and transcriptional regulation of a 9-lipoxygenase gene from olive. *Phytochemistry*, 74, 58-68.
- Paterson, A. H., Chapman, B. A., Kissinger, J. C., Bowers, J. E., Feltus, F. A., & Estill, J. C. (2006). Many gene and domain families have convergent fates following independent whole-genome duplication events in Arabidopsis, Oryza, Saccharomyces and Tetraodon. *Trends in genetics*, 22(11), 597-602.
- Polturak, G., & Osbourn, A. (2021). The emerging role of biosynthetic gene clusters in plant defense and plant interactions. *PLoS Pathogens*, 17(7),

- e1009698.
- Porta, H., & Rocha-Sosa, M. J. P. p. (2002). Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant physiology*, 130(1), 15-21.
- Rosahl, S. (1996). Lipoxygenases in plants-their role in development and stress response. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 51(3-4), 123-138.
- Sarde, S. J., Kumar, A., Remme, R. N., & Dicke, M. (2018). Genome-wide identification, classification and expression of lipoxygenase gene family in pepper. *Plant molecular biology*, 98(4), 375-387.
- Shaban, M., Ahmed, M. M., Sun, H., Ullah, A., & Zhu, L. (2018). Genome-wide identification of lipoxygenase gene family in cotton and functional characterization in response to abiotic stresses. *BMC genomics*, 19(1), 1-13.
- Sharma, M., & Laxmi, A. (2016). Jasmonates: emerging players in controlling temperature stress tolerance. *Frontiers in plant science*, 6, 1129.
- Singh, P., Dutta, P., & Chakrabarty, D. (2021). miRNAs play critical roles in response to abiotic stress by modulating cross-talk of phytohormone signaling. *Plant Cell Reports*, 40(9), 1617-1630.
- Tolley, J. P., Nagashima, Y., Gorman, Z., Kolomiets, M. V., & Koiwa, H. (2018). Isoform-specific subcellular localization of *Zea mays* lipoxygenases and oxo-phytodienoate reductase 2. *Plant Gene*, 13, 36-41.
- Umate, P. (2011). Genome-wide analysis of lipoxygenase gene family in Arabidopsis and rice. *Plant signaling behavior*, 6(3), 335-338.
- Upadhyay, R. K., Handa, A. K., & Mattoo, A. K. (2019). Transcript abundance patterns of 9-and 13-lipoxygenase subfamily gene members in response to abiotic stresses (heat, cold, drought or salt) in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) highlights member-specific dynamics relevant to each stress. *Genes*, 10(9), 683.
- Vellosillo, T., Martínez, M., López, M. A., Vicente, J., Cascón, T., Dolan, L., Hamberg, M., & Castresana, C. (2007). Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in Arabidopsis regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *The Plant Cell*, 19(3), 831-846.
- Viswanath, K. K., Varakumar, P., Pamuru, R. R., Basha, S. J., Mehta, S., & Rao, A. D. (2020). Plant lipoxygenases and their role in plant physiology. *Journal of Plant Biology*, 63(2), 83-95.
- Wang, J., Hu, T., Wang, W., Hu, H., Wei, Q., Wei, X., & Bao, C. (2019). Bioinformatics analysis of the lipoxygenase gene family in radish (*Raphanus sativus*) and functional characterization in response to abiotic and biotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 6095.
- Wennman, A., Oliw, E. H., Karkehabadi, S., & Chen, Y. (2016). Crystal structure of manganese lipoxygenase of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Journal of Biological Chemistry*, 291(15), 8130-8139.
- Zhang, Q., Zhao, Y., Zhang, J., Li, X., Ma, F., Duan, M., Zhang, B., & Li, H. (2021). The Responses of the Lipoxygenase Gene Family to Salt and Drought Stress in Foxtail Millet (*Setaria italica*). *Life*, 11(11), 1169.
- Zheng, S.-J., van Dijk, J. P., Bruinsma, M., & Dicke, M. (2007). Sensitivity and speed of induced defense of cabbage (*Brassica oleracea* L.): dynamics of BoLOX expression patterns during insect and pathogen attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(11), 1332-1345.
- Zhu, J., Wang, X., Guo, L., Xu, Q., Zhao, S., Li, F., Yan, X., Liu, S., & Wei, C. (2018). Characterization and

alternative splicing profiles of the lipoxygenase gene family in tea plant (*Camellia sinensis*). *Plant Cell Physiology*, 59(9), 1765-1781.