



دانشگاه گیلان

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و دوم، شماره دوم، ۱۳۹۴
<http://jopp.gau.ac.ir>

توالی‌یابی و مطالعه فیلوژنتیکی ژن آلترناتیو اکسیداز (aox_2) در

زیرخانواده Anthemideae

*احمد یامچی

استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۲۶

چکیده

سابقه و هدف: گیاهان دارویی، امروزه یکی از حائز اهمیت‌ترین محصولات بخش کشاورزی محسوب می‌شوند. پیشرفت در زمینه گیاهان دارویی یکی از اهداف مهم فعالان بخش کشاورزی در حال حاضر می‌باشد. اگرچه گیاهان دارویی تاکنون در کشور ما بسیار کمتر مورد توجه بوده‌اند ولی اهمیت روز افزون این گیاهان در سراسر دنیا، امروزه توجه بسیاری از بخش‌های کشاورزی را به خود معطوف نموده است. Anthemideae یکی از زیرخانواده‌های مهم در خانواده Asteraceae می‌باشد و دارای ۵ جنس با اهمیت شامل: بومادران (*Achillea sp.*)، بابونه (*Matricaria sp.*)، مخلصه (*Tanacetum sp.*)، درمنه (*Artemisia sp.*) و *Santolina sp.* می‌باشد که اغلب به‌عنوان گیاهان دارویی مهم در پزشکی مطرح می‌باشند. از آنجایی که گیاهان این زیرخانواده، منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی می‌باشند که آنان را از اثرات مضر گونه‌های واکنشگر اکسیژنی حفظ می‌نمایند. آنتی‌اکسیدان‌ها به دو گروه کلی آنزیمی و غیرآنزیمی تقسیم می‌شوند. به‌طور کلی آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های تولید شده به‌صورت شیمیایی عوارض کمتری دارند. آلترناتیو اکسیداز یکی از آنزیم‌های مهم در زنجیره انتقال الکترون می‌باشد که مسئول مسیر تنفس آلترناتیو است و ژن aox_2 کدکننده یکی از زیرواحدهای این آنزیم می‌باشد. بنابراین شناسایی، ردیابی و توالی‌یابی ژن‌های کدکننده این ترکیبات در گیاهان زیرخانواده Anthemideae ضروری به‌نظر می‌رسد.

*مسئول مکاتبه: yamchi@gau.ac.ir

مواد و روش‌ها: ابتدا براساس هم‌ردیف‌سازی چندتایی توالی‌های جستجو شده برای گیاه مدل آرابیدوپسیس و سایر گیاهان در پایگاه داده‌های بانک ژن (NCBI)، انجام شد. آغازگرهای اختصاصی به‌صورت هرز برای نواحی حفاظت شده آمینواسیدی (Active site) پروتئین AOX2 طراحی شدند. آغازگرها در جنس‌های زیرخانواده Anthemideae ناحیه‌ای به طول تقریبی ۳۰۰ جفت نوکلئوتید را تکثیر نمودند و در ادامه تعیین توالی شدند.

یافته‌ها: نتایج حاصل از جستجو با ابزار BLAST در پایگاه داده‌های NCBI برای توالی‌های به‌دست آمده، صحت توالی‌های مذکور را تأیید نمود. همچنین حضور ناحیه فعال پروتئینی در این توالی‌ها، تأیید دیگری بر صحت توالی‌های به‌دست آمده بود. به‌منظور بررسی تنوع ژن *aox2* بین جنس‌های مهم زیرخانواده Anthemideae میانگین کل Pairwise distance بر اساس دو مدل K₂P و P-distance و بر اساس توالی نوکلئوتیدها (جایگزینی‌های هم‌جنس Transition و ناهم‌جنس Transversion نوکلئوتیدها) از نرم‌افزار Mega نسخه ۵ استفاده و درصد تنوع محاسبه گردید. داده‌های حاصل از آن‌ها نشان دادند جنس‌های مذکور از نظر ژن *aox2* حفاظت شده می‌باشند و *Matricaria sp.* و *Achillea sp.* نزدیک‌ترین جنس‌ها به یکدیگر و جنس‌های *Artemisia sp.* و *Chrysanthemum sp.* دورترین جنس‌ها از یکدیگر محسوب می‌شوند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از ترسیم نمودار خوشه‌ای برای ژن *aox2* حفاظت شدگی بالای *aox2* را در جنس‌های مذکور تأیید نمود.

واژه‌های کلیدی: Anthemideae، آنتی‌اکسیدان، ژن *aox2*

مقدمه

گیاهان در معرض تنش‌های زنده و غیرزنده متنوعی می‌باشند که علت آن وقوع شرایط غیرقابل اجتنابی است که باعث راه‌اندازی یک سری از تغییرات مولکولی، بیوشیمیایی و ریخت‌شناسی در گیاهان می‌شود. اولین اثر تنش‌های غیرزنده به هم خوردن تعادل یونی و بروز تنش‌های هیدرواسموتیک می‌باشد (۱) و منجر به افزایش تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژنی (ROS) شده که از عوامل اکسید کننده مولکول‌های زیستی سلولی می‌باشند.

گیاهان از راهبردهای دفاعی شامل سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی مانند آلترناتیواکسیداز برای حذف اکسیژن فعال استفاده می‌نمایند (۳ و ۵). در میتوکندری گیاهان عالی دو مسیر اکسیداسیون منحصر به فرد از یوبیکوئینون به اکسیژن وجود دارد: یکی از آن‌ها مسیر سیتوکروم حساس به سیانید و دیگری مسیر آلترناتیو مقاوم به سیانید است. در انتقال الکترون به واسطه مسیر آلترناتیو، اکسیدکننده‌ی نهایی آنزیم آلترناتیو اکسیداز (AOX) می‌باشد که نقش مهمی در کاهش تولید انواع اکسیژن فعال (ROS) در اندامک‌های کلروپلاست و میتوکندری دارد. این آنزیم به صورت یک هومودایمر در بین غشای داخلی میتوکندری قرار می‌گیرد. این آنزیم در سویا سه، در تنباکو دو و در آرابیدوپسیس چهار ایزوفرم دارد.

Anthemideae یکی از زیرخانواده‌های مهم تیره کاسنی است و جنس‌های موجود در این زیرخانواده به علت دارا بودن ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی فراوان منابع مناسبی برای ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی محسوب می‌شوند. از جمله مهم‌ترین جنس‌های این زیرخانواده می‌توان به جنس‌های *Matricaria sp.* (بابونه)، *Chrysanthemum sp.* (داوودی)، *Tanacetum sp.* (مخلصه)، *Artemisia sp.* (درمنه)، *Achillea millefolium* (بومادران) و *Santolina sp.* اشاره نمود. هیچ یک از زیرواحدهای آنزیم *aox* در گیاهان دارویی زیرخانواده Anthemideae تاکنون شناسایی و توالی‌یابی نشده‌اند و هیچ گونه مطالعه‌ای در این زمینه گزارش نشده است.

مواد و روش‌ها

الف- تهیه نمونه‌های گیاهی و استخراج DNA: به منظور تهیه نمونه‌های گیاهی، بذر نمونه‌های مذکور خریداری و در گلدان‌هایی حاوی خاک مخلوط با ماسه کشت شدند. پس از گذشت دو الی سه ماه از تاریخ کشت از جنس‌های مختلف نمونه‌های برگ‌ی تهیه شده و برای استخراج DNA مورد استفاده قرار

گرفتند. استخراج DNA ژنومی با روش موری و تامسون تغییر یافته انجام گرفت (۲). پس از استخراج DNA، کیفیت و کمیت آن با استفاده از ژل آگاروز ۰/۷ درصد و اسپکتروفتومتر بررسی گردید.

ب- طراحی آغازگرهای اختصاصی و انجام واکنش PCR: به منظور طراحی آغازگر با مراجعه به پایگاه داده‌های بانک ژن در NCBI توالی نوکلئوتیدی و توالی آمینواسیدی ژن *aox2* برای گیاه مدل آرابیدوپسیس و سایر گیاهان به دست آمد. هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA نسخه ۵ به صورت جداگانه برای توالی‌های نوکلئوتیدی و توالی‌های آمینواسیدی صورت گرفت. نواحی حفاظت شده آمینواسیدی^۱ برای پروتئین AOX از Scan prosite^۲ جستجو شد و پس از مشخص نمودن این نواحی بر روی توالی‌های هم‌ردیف شده پروتئینی، ناحیه متناظر با آن روی توالی‌های نوکلئوتیدی نیز شناسایی گردید و سپس از این نواحی حفاظت شده آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار OLIGO نسخه ۵ طراحی شد. آغازگرها به صورت هرز طراحی شدند تا توانایی انعطاف تکثیر در جنس‌های موردنظر را داشته باشند. توالی آغازگر پیشرو و پس رو به ترتیب 5'-AGAAGCMGARAAYGARAGGATG-3' و 5'-CTCCARTARTCWATAGCAATMGC-3' می‌باشد. واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰ برابر غلظت، ۲ میلی‌مولار کلرید منیزیم، یک واحد آنزیم Taq DNA پلیمراز، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۰/۳ میکرومولار از هر آغازگر و حدود ۲۰ نانوگرم DNA در دستگاه ترموسایکلر شرکت Biorad و طبق برنامه ۱' / ۷۲°C + ۱' / ۹۴°C + ۳۴ x [۱' / ۹۴°C + ۵' / ۹۵°C] انجام شد.

ج- همسانه‌سازی و توالی‌یابی قطعات تکثیر شده: به منظور توالی‌یابی قطعات موردنظر، الحاق محصولات حاصله از واکنش PCR به پلاسمید pTZ57R/T تهیه شده از کیت PCR InsTAclone™ Cloning Kit (Fermentas Co.) انجام شد. سپس با استفاده از روش الکتروپوریشن پلاسمیدهای نوترکیب به داخل باکتری *E. coli* MC1061 منتقل شدند. پس از کشت کلون‌ها روی محیط‌های LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و رشد آن‌ها، به منظور تشخیص و تأیید همسانه‌های حاوی پلاسمید نوترکیب از سه روش (۱) غربالگری سریع، (۲) انجام واکنش Colony PCR (۳) استخراج پلاسمید از همسانه‌ها و هضم آنزیمی، استفاده گردید. پس از انجام این مراحل، همسانه‌هایی که حاوی قطعه موردنظر بودند توالی‌یابی شدند.

1- Active site

2- <http://prosite.expasy.org/scanprosite>

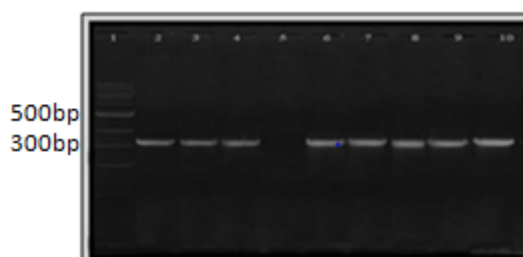
د- تجزیه و تحلیل داده‌ها: پس از دریافت نتایج توالی‌یابی، الکتروگرام توالی هر نمونه با نرم‌افزار Chromas نسخه ۲/۱۳ بررسی گردید و از کیفیت مناسب آن‌ها اطمینان حاصل گردید. از آنجا که نتایج حاصل از توالی‌یابی، حاوی توالی پلاسمید pTZ57R/T نیز بود با به‌دست آوردن اطلاعات مربوط به توالی این پلاسمید در پایگاه داده‌های NCBI، هم‌ردیف‌سازی چندگانه بین توالی پلاسمید و توالی‌های مربوط ناحیه‌های ژنی موردنظر با استفاده از نرم‌افزار Multalin انجام گرفت و پس از انجام هم‌ردیف‌سازی و مشخص شدن نواحی مربوط به پلاسمید، این نواحی از توالی ژنی موردنظر جداسازی شد. سپس با استفاده از ابزار BLAST موجود در پایگاه داده‌های NCBI صحت توالی‌ها، مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌ها با یکدیگر و نیز با توالی‌های مربوط به گیاهان دیگر در پایگاه داده‌های NCBI، با استفاده از نرم‌افزارهای Mega و Multalin صورت گرفت. به‌منظور بررسی درصد تنوع ژن *aox2* بین جنس‌های مهم زیرخانواده Anthemideae و نیز بین جنس‌های مدنظر با سایر جنس‌های گیاهی با استفاده از نرم‌افزار ARLEQUIN نسخه ۳/۱ تعداد جایگزینی‌های هم‌جنس^۱ و ناهم‌جنس^۲ محاسبه گردید و پس از آن تعداد کل جایگزینی، حذف و اضافه به تعداد کل نوکلئوتیدها تقسیم شده و درصد تنوع برای ژن *aox2* به‌دست آمد. همچنین میانگین pairwise distance بر اساس دو مدل K2P و P-distance با استفاده از نرم‌افزار MEGA نسخه ۵ به‌دست آمد. در این مقاله تمام فاصله‌های ژنتیکی محاسبه شده براساس میانگین P-distance صورت گرفت و این به‌دلیل عدم تساوی نمونه‌های موجود بود. همچنین به‌منظور بررسی رابطه فیلوژنی جنس‌های زیرخانواده Anthemideae از نظر ژن *aox2* با استفاده از نرم‌افزار MEGA نسخه ۵ تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی داده‌ها با استفاده از ضریب حداکثر صرفه‌جویی^۳ صورت گرفت و نمودارهای خوشه‌ای رسم گردید. به‌منظور مقایسه تنوع جنس‌های مهم زیر خانواده Anthemideae از نظر ژن *aox2* درصد شباهت با استفاده از ابزار جستجوی شباهت‌ها^۴ در سایت (<http://www.ebi.ac.uk>) به‌دست آمد. همچنین برای بررسی توالی‌های آمینواسیدی، توالی‌های نوکلئوتیدی به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار MEGA نسخه ۵ به توالی‌های اسید آمینه‌ای تبدیل شد و سپس با استفاده از ابزار جستجوی Scan Prosit

-
- 1- Transition
 - 2- Transversion
 - 3- Maximum parsimony (MP)
 - 4- Sequence similarity tool

در سایت Expasy نواحی فعال پروتئینی (Activ site) برای هر کدام از توالی‌های آمینواسیدی به صورت جداگانه جستجو گردید.

نتایج و بحث

الف) طول قطعات تکثیر شده: آغازگرهای طراحی شده برای ژن *aox2* توانستند ناحیه‌ای از این ژن را در جنس‌های *Achillea* sp.، *Chrysanthemum* sp.، *Santolina* sp.، *Artemisia* sp.، *Matricaria* sp. و *Tanacetum* sp. تکثیر نمایند که تنها یک نماینده از هر جنس برای توالی‌یابی فرستاده شد. پس از به دست آوردن داده‌های حاصله از توالی‌یابی و حذف توالی پلاسمیدی، ناحیه‌ای از ژن *aox2* در حدود ۳۰۰ جفت نوکلئوتید مشخص گردید (شکل ۱).

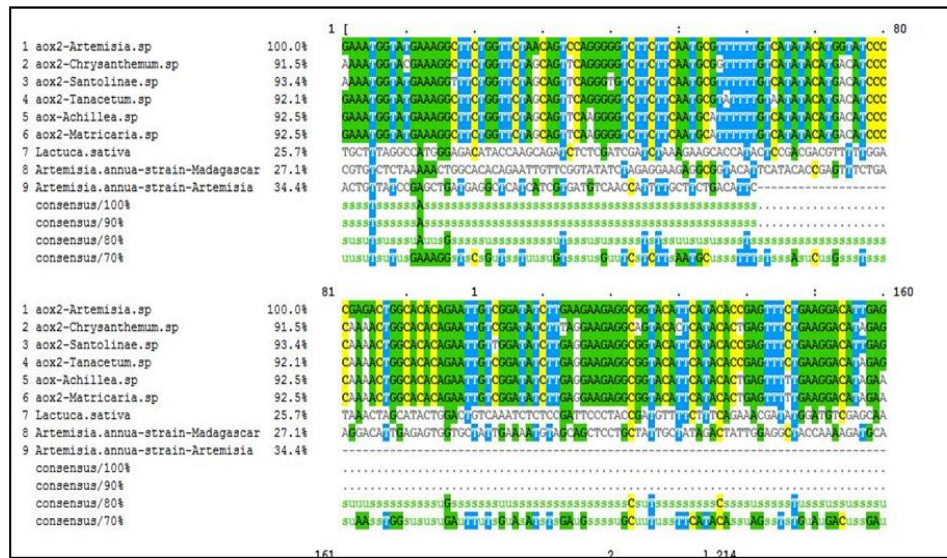


شکل ۱) نتایج حاصل از PCR با استفاده از آغازگرهای *aox2* چاهک اول مارکر **bp 100**، چاهک ۵ کنترل منفی و بقیه چاهک‌ها نشان دهنده باند **bp 300** تکثیر شده از جنس‌های زیر خانواده **Anthemideae** می‌باشد.

Figure 1. The results of PCR using primers *aox2*. First well is 100 bp ladder, The fifth well is negative control and other wells indicates the band 300 bp amplified production from Anthemideae subfamily

نتایج حاصل از BLAST توالی‌های به دست آمده در جنس‌های مذکور برای ژن *aox2* که با استفاده از ابزار جستجوی BLAST موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI صورت گرفت، نشان‌دهنده هم‌ردیف شدن توالی‌های مذکور با ژن‌های همتای خود در سایر گیاهان موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI بود، که این امر صحت توالی‌های به دست آمده را تأیید نمود.

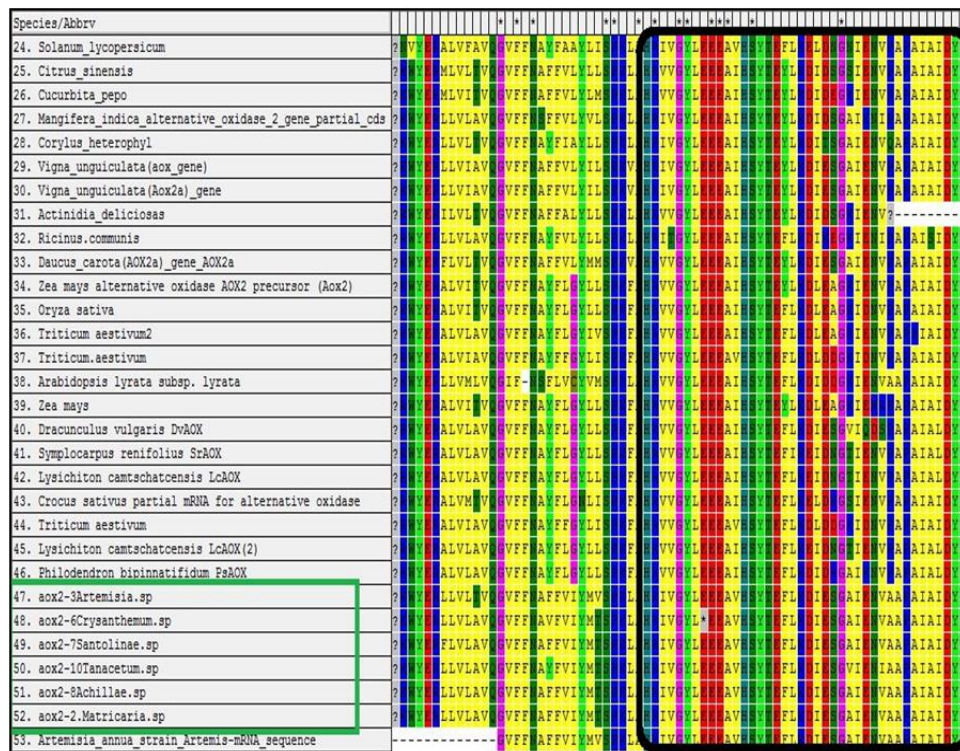
بررسی درصد شباهت بین جنس‌های مهم زیرخانواده **Anthemideae** با سایر جنس‌های خانواده کاسنی صورت گرفت و نتایج به خوبی نشان داد که جنس‌های زیرخانواده مذکور اگرچه از نظر ژن *aox2* به یکدیگر نزدیک می‌باشند اما با سایر جنس‌های خانواده فاصله دارند (شکل ۲).



شکل ۲- نتایج حاصل از بررسی درصد شباهت بین جنس‌های زیرخانواده *Anthemideae* با سایر جنس‌های خانواده کاسنی در ژن *aox2*

Figure 2. The results of the similarity between the genera belong to *Anthemideae* subfamily with other genera of *Asteraceae* family for *aox2* gene

ج) بررسی توالی‌های آمینو اسیدی: به منظور بررسی توالی‌های آمینو اسیدی ابتدا بر اساس توالی ژن *aox2* در گیاه مدل آرانیوپسیس، چهارچوب قرائت صحیح به دست آمد. هم‌ردیف شدن توالی آمینو اسیدی حاصل از ترجمه توالی نوکلئوتیدی ناحیه ژنی *aox2* در جنس‌های *Artemisia* sp.، *Matricaria* sp.، *Tanacetum* sp.، *Achillea* sp. و *Chrysanthemum* sp. با توالی پروتئینی ژن *aox2* در گیاه آرانیوپسیس و سایر گیاهان موجود در پایگاه داده‌های NCBI (شکل ۳) سند دیگری برای اثبات صحت توالی مذکور بود.



شکل ۳- بررسی توالی‌های آمینواسیدی حاصل از ترجمه توالی نوکلئوتیدی ناحیه ژنی *aox2* در جنس‌های *Chrysanthemum sp.* و *Achillea sp.*، *Tanacetum sp.*، *Santolina sp.*، *Artemisia sp.*، *Matricaria sp.* مقایسه آن با توالی پروتئین AOX₂ در سایر گیاهان.

Figure 3. Study amino acid sequence alignments of *aox2* gene between the genus of *Matricaria sp.*، *Artemisia sp.*، *Santolina sp.*، *Tanacetum sp.*، *Achillea sp.* and *Chrysanthemum sp.* and some other plants.

همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود توالی آمینواسیدی حاصله از ناحیه ژنی *aox2* در جنس‌های مذکور که با توالی پروتئینی در گیاه آرابیدوپسیس و گونه *A. annua* و نیز سایر گیاهان موجود در پایگاه داده‌های NCBI به‌دست آمده است به‌خوبی هم‌ردیف شده‌اند. در شکل ۳ ناحیه‌ای که با رنگ مشکی مشخص شده همان ناحیه حفاظت شده‌ای است که به‌منظور طراحی آغازگر مورد استفاده قرار گرفته بود و همان‌طور که ملاحظه می‌شود ناحیه حفاظت شده مدنظر در جنس‌های مذکور زیرخانواده Anthemideae نیز وجود دارد.

د) بررسی تنوع و روابط فیلوژنی جنس‌های زیرخانواده Anthemidae از نظر ژن *aox2* به‌منظور بررسی تنوع، میانگین Pairwise distance بر اساس مدل K2P و نیز بر اساس مدل P-distance بین

جنس‌های مدنظر با یکدیگر، بین جنس‌های مذکور و گیاه آرابیدوپسیس به‌عنوان یک جنس برون خانواده‌ای، بین جنس‌های مذکور و توالی جنس *A. annua* به‌عنوان یک جنس هم‌زیرخانواده‌ای و نیز بین جنس‌های مذکور با جنس *Lactuca sativa* به‌عنوان یک جنس هم‌خانواده‌ای، محاسبه گردید. نتایج حاصل از این محاسبات در جدول ۱ آورده شده است.

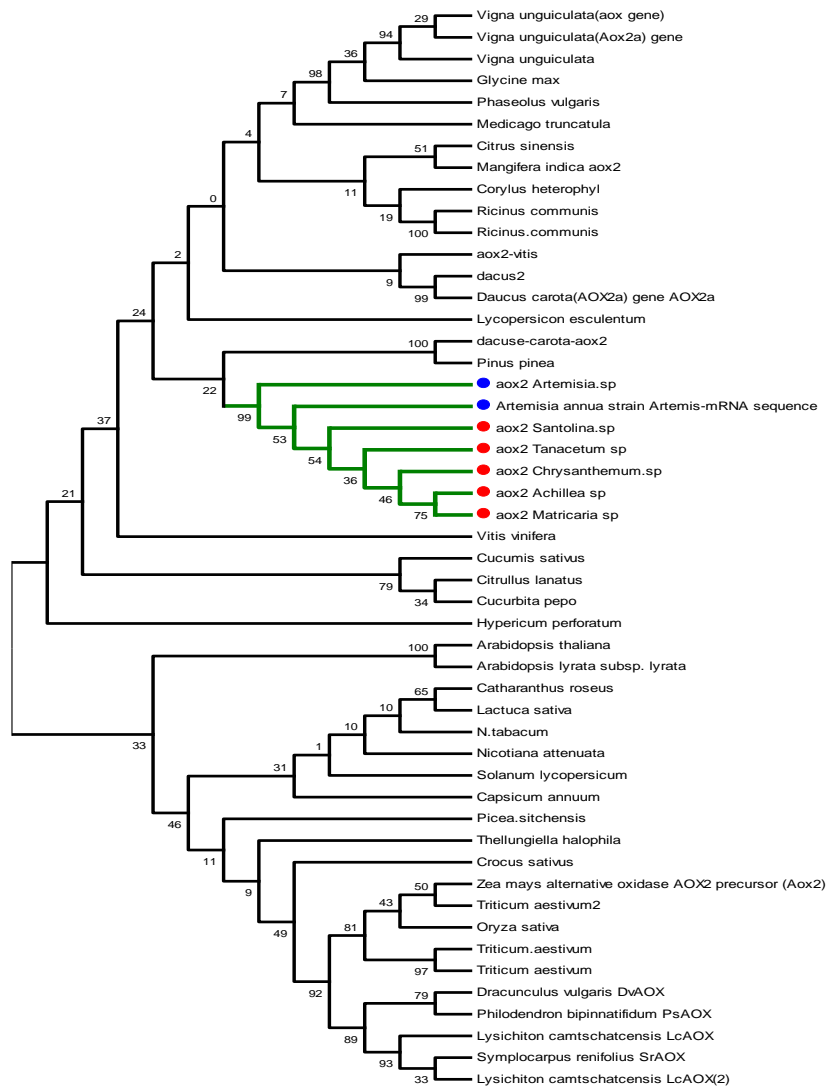
جدول ۱- بررسی میزان تنوع بین جنس‌های زیرخانواده *Anthemidae* با یکدیگر و همچنین با جنس *A. annua*، *A. thaliana* و جنس *L. sativa* بر اساس سه پارامتر میانگین کل *Pairwise distance* و بر اساس مدل *K₂P* و *P-distance* و نیز درصد تنوع بر مبنای جایگزینی‌های همجنس و ناهمجنس از نظر ژن *aox2*

Table 1. Evaluation of the genetic variation among genera of *Anthemidae* subfamily with each other and also with *A. annua*, *A. thaliana* and *L. sativa* genera based on three parameters of *Pairwise distance* and based on *K₂P* and *P-distance* and diversity of transition and transversion substitutions of *aox2* gene

درصد تنوع بر اساس جایگزینی‌های همجنس و ناهمجنس genetic diversity based on transition and transversion substitutions	میانگین کل <i>Pairwise distance</i> بر اساس مدل <i>P-distance</i> Total average <i>Pairwise distance</i> on the base of <i>P-distance</i> model	میانگین کل <i>Pairwise distance</i> بر اساس مدل <i>K₂P</i> Total average <i>Pairwise distance</i> based on of <i>K₂P</i> model	شماره ثبت جدید در NCBI Accession number in NCBI	نام جنس Genus name
% 14.5	0.059	0.063	KF585051	<i>Matricaria</i> sp.
			KF585046	<i>Artemisia</i> sp.
			KF585048	<i>Santolina</i> sp.
			KF585049	<i>Tanacetum</i> sp.
			KF585050	<i>Achillea</i> sp.
% 40.37	0.30	0.39	KF585047	<i>Chrysanthemum</i> sp.
				<i>Matricaria</i> sp.
				<i>Artemisia</i> sp.
				<i>Santolinae</i> sp.
				<i>Tanacetum</i> sp.
				<i>Achilleasp.</i>
				<i>Chrysanthemum</i> sp.
% 14.2	0.042	0.045		<i>Arabidopsis thaliana</i>
				<i>Matricaria</i> sp.
				<i>Artemisia</i> sp.
				<i>Santolinae</i> sp.
				<i>Tanacetum</i> sp.
% 37.22	0.286	0.368		<i>Achillea</i> sp.
				<i>Chrysanthemum</i> sp.
				<i>Artemisia annua</i>
				<i>Matricaria</i> sp.
				<i>Artemisia</i> sp.
	<i>Santolinae</i> sp.			
	<i>Tanacetum</i> sp.			
	<i>Achillea</i> sp.			
	<i>Chrysanthemum</i> sp.			
	<i>Lactuca sativa</i>			

داده‌های به دست آمده از محاسبه میانگین‌های K_2P و P -distanc و نیز داده‌های حاصله از بررسی درصد تنوع براساس جایگزینی‌های هم‌جنس و ناهم‌جنس (جدول ۱)، نشان‌دهنده وجود بیشترین درصد تنوع (بالای ۴۰ درصد) و نیز بیشترین فاصله ژنتیکی بین جنس‌های مذکور با گیاه مدل آرابیدوپسیس می‌باشند. در حالی که درصد تنوع و فاصله ژنتیکی بین جنس‌های مذکور با یکدیگر و نیز با جنس *A. annua* بسیار کمتر از این می‌باشد، که این امر به خوبی نشان می‌دهد جنس‌های مذکور در طی تکامل از نظر ژن *aox2* فاصله ژنتیکی زیادی با یکدیگر پیدا نموده‌اند. ولی نمودارها حاکی از وجود فاصله ژنتیکی و درصد تنوع زیاد بین جنس‌های مذکور زیرخانواده *Anthemideae* با جنس هم‌خانواده خود یعنی جنس *Lactuca sativa* می‌باشند که این تنوع مشاهده شده، به میزان تنوع موجود بین جنس‌های مذکور با جنس آرابیدوپسیس (یک جنس برون‌خانواده‌ای) نزدیک است. این تنوع بالا، احتمالاً بیان‌کننده این واقعیت می‌باشد که جنس‌های زیرخانواده *Anthemideae* از نظر ژن *aox2* به خوبی حفاظت شده‌اند اما بین جنس‌های خانواده *Asteraceae* از نظر این ژن حفاظت شدگی چندانی مشاهده نمی‌گردد. به عبارت دیگر جنس‌های مذکور با جنس‌های هم‌خانواده خود که متعلق به زیرخانواده دیگری از خانواده *Asteraceae* می‌باشند مانند *Lactuca sativa* فاصله ژنتیکی زیادی پیدا نموده‌اند که این شواهد به خوبی نشان می‌دهند جنس‌های مذکور در زیرخانواده *Anthemideae* از نظر تکامل مسیر تنفسی آلترناتیواکسیداز با یکدیگر همسو بوده‌اند. اما تغییرات محیطی و تکاملی که اعضای زیرخانواده *Anthemideae* را از سایر جنس‌ها و زیرخانواده‌های *Asteraceae* تفکیک نموده است منجر به بروز فاصله ژنتیکی زیاد، از نظر ژن *aox2* نیز گردیده است. هم‌چنین وجود فاصله ژنتیکی و درصد تنوع زیاد بین جنس‌های مذکور در زیرخانواده *Anthemideae* با جنس آرابیدوپسیس تأیید دیگری بر این واقعیت می‌باشد که اعضای خانواده ژنی کد کننده آنزیم *aox* در طول تکامل دست‌خوش تغییرات زیادی بوده‌اند.

به منظور بررسی بهتر روابط فیلوژنتیکی بر اساس ژن *aox2* بین جنس‌های مذکور در زیرخانواده *Anthemideae*، درخت فیلوژنی بر اساس روش حداکثر صرفه‌جویی و به کمک گیاهان موجود در پایگاه داده‌های NCBI بر اساس توالی ژن *aox2* رسم گردید که نتایج آن در شکل ۴ قابل مشاهده می‌باشد.



شکل ۴- نمودار خوشه‌ای مربوط به روابط ژنتیکی جنس‌های *Santolina sp.*, *Artemisia sp.*, *Matricaria sp.*, *Tanacetum sp.* و *Achillea sp.*, *Chrysanthemum sp.* در زیر خانواده *Anthemideae* و جایگاه آنان در ارتباط با سایر جنس‌های موجود پایگاه داده‌های NCBI بر اساس ژن *aox2* با استفاده از ضریب *Maximum parsimony*. جنس‌های مذکور زیر خانواده *Anthemideae* با رنگ سبز مشخص شده است.

Figure 4. Chart cluster of genetic relationships in *Matricaria sp.*, *Artemisia sp.*, *Santolina sp.*, *Chrysanthemum sp.*, *Achillea sp.* and *Tanacetum sp.* genus of *Anthemideae* subfamily and their position in relation to other existing genera in NCBI database based on *aox2* gene, using the coefficient *Maximum parsimony*. the genera belong to *Anthemideae* subfamily has been marked by green color.

به‌طور کلی جنس‌های زیرخانواده Anthemideae به گروه‌های کوچک‌تری طبقه‌بندی می‌شوند که به آن‌ها بخش‌های گیاهی گفته می‌شود. جنس‌های *Achillea* sp. و *Matricaria* sp. از نظر رده‌بندی در بخش گیاهی Matricariinae قرار می‌گیرند (۶). نتایج حاصل از محاسبه میانگین Pairwise-distance (براساس مدل K2P) از نظر ژن *aox2* نیز به‌خوبی نشان داد که در بین جنس‌های اشاره شد. این دو جنس کمترین فاصله ژنتیکی را با یکدیگر نشان دادند که به‌خوبی این واقعیت را تأیید می‌کند. در نمودار خوشه‌ای شکل ۴ نیز که بر اساس ژن *aox2* رسم گردید نیز این دو جنس در یک گروه در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. Watson و همکاران (۲۰۰۰) و هم‌چنین Himmelreich و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از ژن کلروپلاستی *ndhf* و نشانگر مولکولی ITS روابط فیلوژنی زیرخانواده Anthemideae را مورد بررسی قرار دادند و نتایج آن‌ها نشان داد که جنس‌های *Achillea* sp. و *Matricaria* sp. در یک گروه قرار گرفته و جنس *Tanacetum* sp. نزدیکترین جنس به آن‌ها می‌باشد (۴ و ۶). طبقه‌بندی براساس ژن *ndhf* کلروپلاستی و نیز براساس نشانگر مولکولی ITS با داده‌های به‌دست آمده از محاسبه میانگین Pairwise-distance (براساس مدل K2P) در جدول ۱ که بر مبنای ژن *aox2* انجام گرفته است، همسو می‌باشد اما در نمودار خوشه‌ای رسم شده در شکل ۴ این جنس‌ها به *Chrysanthemum* sp. نزدیکتر می‌باشند. احتمال می‌رود که این تفاوت ناشی از این امر می‌باشد که ژن‌های کلروپلاستی به‌دلیل حفاظت شدگی بیشتر دقیق‌تر می‌باشند در حالی که ژن‌های هسته‌ای مانند ژن *aox2* تکامل بیشتری حاصل می‌نمایند و تنوع در آن‌ها بسیار بیشتر از ژن‌های کلروپلاستی به چشم می‌خورد و به‌همین منظور بررسی روابط فیلوژنی بر اساس آن‌ها به‌همراه ژن‌های کلروپلاستی قابل اعتمادتر است. با توجه به اهمیت گیاهان دارویی و حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در آن‌ها مطالعات و بررسی‌ها در رابطه با این ژن‌ها رو به افزایش است ولی در زمینه ژن مذکور مطالعات مشابهی در جنس‌های زیر خانواده Anthemideae وجود ندارد. از معدود مطالعاتی که در این زمینه صورت گرفته است می‌توان به پژوهشی که در آن ژن‌های کدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی GPX، APX، CAT و SOD در گیاه دارویی جینسینگ (*Panax ginseng*) شناسایی شد، اشاره نمود (۷). در مطالعه مذکور بر اساس توالی‌های به‌دست آمده در آنزیم‌های مذکور، بیان ژن‌های کدکننده این آنزیم‌ها در شرایط تنش‌های زنده و غیرزنده بررسی گردید. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه به‌خوبی نشان داد که روش جستجوی شباهت‌ها به‌خوبی توانست توالی ژن *aox2* را در جنس‌هایی که تاکنون هیچ توالی مشابهی برای آن‌ها در دسترس نبوده، شناسایی نماید.

منابع

1. Ahmad, P., Jaleel, C.A., Ozooz, M.M., Nabi, G. 2009. Generation of ROS and nonenzymatic antioxidants during abiotic stress in plants. Bot. Res. Int. 2: 11-20.
2. Murry, M., Thompson, W.F. 1984. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl. Acid. Res. 8: 4321-4325.
3. Granczarska, M. 2005. Response of the ascorbate-glutathione cycle to re-aeration following hypoxia in lupine roots. Plant Physiol. Biochem. 43: 583-590.
4. Himmelreich, S., Kllersj, M., Eldens, P., and Oberprieler, C. 2008. Phylogeny of southern hemisphere Compositae- Anthemideae based on nrDNA ITS and cpDNA *ndhF* sequence information. Plant System. Evol. 272: 131-153.
5. Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci. 7: 405-410.
6. Watson, L.E., Evans, T.M., Bluarte, T. 2000. Molecular phylogeny and biogeography of tribe Anthemideae (Asteraceae), based on chloroplast gene *ndhf*. Molecul. Phylogen. Evol. 5: 59-69.
7. Yang, D.C., Sathiyaraj, G., Lee, O.R., Parvin, S., Khorolragchaa, A., Kim, Y.J. 2010. Transcript profiling of antioxidant genes during biotic and abiotic stresses in *Panax ginseng* C.A. Meyer. Molecul. Biol. Rep. 10: 458-4668.

